



(12) Ausschließungspatent

(11) DD 296 963 A5

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1
Patentgesetz der DDR
vom 27. 10. 1983
in Übereinstimmung mit den entsprechenden
Festlegungen im Einigungsvertrag

5(51) C 12 N 15/12
C 07 K 13/00
A 61 K 37/02

DEUTSCHES PATENTAMT

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	DD C 12 N / 342 854 1	(22)	17.07.90	(44)	19.12.91
(31)	07/381,080	(32)	18.07.89	(33)	US
	07/450,329		11.12.89		
	07/479,661		07.02.90		

- (71) siehe (73)
 (72) Brewer, Michael T., US; Hale, Karin K., US; King, Michael W., US; Kohno, Tadahiko, JP; Squires, Charles, US; Thompson, Robert C., GB; Vanderslice, Rebecca W., US; Vannice, James, US
 (73) Synergen, Inc., 1885 33 rd Street, Boulder, Colorado 80301, US
 (74) D. Erich & B. Tragsdorf, Patentanwälte, August-Bebel-Ring 36, O - 1607 Niederlehme, DE

(54) Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF-) Inhibitor und Verfahren zu seiner Herstellung

(55) Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF-) Inhibitoren; 30 kDa und 40 kDa Glycoprotein; gereinigte Form; aktiv gegen TNF alpha und beta; Aminosäuresequenz; rekombinante DNA-Methode; Herstellung TNF-Inhibitor; Gentechnik; pharmazeutische Formulierungen

(57) Die Erfindung betrifft Tumor-Nekrose-Faktor- (TNF-) Inhibitoren und Verfahren zu ihrer Herstellung. Die Erfindung wird in der Gentechnik angewendet und die Inhibitoren finden in pharmazeutischen Formulierungen Verwendung. Es wurde ein beträchtlich gereinigter TNF-Inhibitor, der gegen TNF aktiv ist, gefunden. Ein 30 kDa Glycoprotein und ein 40 kDa Glycoprotein wurden in ihrer gereinigten Form erhalten, wobei der 40 kDa TNF-Inhibitor aktiv gegen TNF alpha und TNF beta ist. Die Aminosäuresequenz dieser Inhibitoren ist offenbart. Angegeben ist auch eine rekombinante DNA-Methode zur Herstellung eines TNF-Inhibitors. Durch die erfindungsgemäßen neuen TNF-Inhibitoren können die schädlichen Auswirkungen des TNFs verhindert werden.

Patentansprüche:

1. Ein beträchtlich gereinigter, Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Inhibitor, der gegen TNF aktiv ist.
2. TNF-Inhibitor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 30 kDa ist.
3. TNF-Inhibitor nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor deglycosyliert ist und ein Molekulargewicht von ungefähr 18 kDa hat.
4. TNF-Inhibitor nach Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor durch rekombinante DNA-Methoden hergestellt ist.
5. TNF-Inhibitor nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor ein Glycoprotein mit einem Molekulargewicht von ungefähr 40 kDa ist.
6. TNF-Inhibitor nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor aktiv ist gegen beide, TNF alpha und TNF beta.
7. TNF-Inhibitor nach Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor deglycosyliert ist.
8. TNF-Inhibitor nach Anspruch 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor die Aminosäuresequenz wie in Fig. 19 gezeigt besitzt.
9. TNF-Inhibitor nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor die Aminosäuresequenz wie in Fig. 38 gezeigt hat.
10. TNF-Inhibitor nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor 40 kDa TNF-Inhibitor $\Delta 51$ ist.
11. TNF-Inhibitor nach Anspruch 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor 40 kDa TNF-Inhibitor $\Delta 53$ ist.
12. Eine rekombinante DNA-Methode zur Herstellung eines TNF-Inhibitors, umfassend:
 - (a) Herstellung einer DNA-Sequenz, die eine Wirtszelle dahin lenken kann, ein Protein mit TNF-Inhibitortaktivitäten herzustellen;
 - (b) Klonieren der DNA-Sequenz in einen Vektor, der in eine ganze Zelle transferiert und dort repliziert werden kann, wobei der Vektor zum Expressieren der DNA-Sequenz benötigte Funktionselemente enthält;
 - (c) Transferieren des Vektors, enthaltend die synthetische DNA-Sequenz und Funktionselemente, in einen Wirt, der die den TNF-Inhibitor codierende DNA exprimieren kann;
 - (d) Kultivieren der Wirtszellen unter Bedingungen, die geeignet sind, den Vektor zu amplifizieren und den Inhibitor zu exprimieren;
 - (e) Ernten des Inhibitors; und
 - (f) dem Inhibitor ermöglichen, eine aktive Tertiärstruktur anzunehmen, wodurch er TNF-Inhibitoraktivität besitzt.
13. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor 30 kDa TNF-Inhibitor ist.
14. Verfahren nach Anspruch 12, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor 40 kDa TNF-Inhibitor ist.
15. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor 40 kDa TNF-Inhibitor $\Delta 51$ ist.
16. Verfahren nach Anspruch 14, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor 40 kDa TNF-Inhibitor $\Delta 53$ ist.
17. Ein Gen, das für Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Inhibitor codiert.
18. Gen nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor 30 kDa TNF-Inhibitor ist.
19. Gen nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor reifer 40 kDa TNF-Inhibitor ist.
20. Gen nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor 40 kDa TNF-Inhibitor $\Delta 51$ ist.
21. Gen nach Anspruch 17, **dadurch gekennzeichnet**, daß der TNF-Inhibitor 40 kDa TNF-Inhibitor $\Delta 53$ ist.

Hierzu 61 Seiten Zeichnungen

Die Erfindung betrifft Tumor-Nekrose (TNF)-Inhibitoren und Verfahren zu ihrer Herstellung, allgemein TNF-Inhibitor und speziell einen TNF-Inhibitor aus Harn stammend sowie biologisch aktive Analoga dieses Inhibitors. Die Erfindung wird in der Gentechnik angewendet, und die Inhibitoren finden in pharmazeutischen Formulierungen Verwendung.

Tumor-Nekrose-Faktoren sind eine Klasse von Proteinen, die von vielen Zelltypen hergestellt werden, einschließlich Monozyten und Makrophagen. Mindestens zwei TNFs sind zuvor beschrieben worden, speziell TNF alpha und TNF beta (Lymphotoxin). Diese bekannten TNFs haben wichtige physiologische Effekte auf eine Anzahl verschiedener Zielzellen, die an Entzündungsantworten beteiligt sind. Die Proteine veranlassen Fibroblasten und Synovialzellen, latente Kollagenase und Prostaglandin E₂ auszuschneiden und veranlassen osteoblastische Zellen, die Knochenresorption durchzuführen. Diese Proteine steigern die oberflächenadhäsiven Eigenschaften von endothelialen Zellen für Neutrophile. Sie veranlassen auch endotheliale Zellen, Gerinnungsmittel auszuschneiden und verringern ihre Fähigkeit, Gerinnsel aufzulösen.

Zusätzlich leiten sie die Aktivität von Adipozyten weg von der Speicherung von Lipiden, indem sie die Expression des Enzyms Lipoproteinlipase hemmen. TNFs veranlassen Hepatozyten, eine Klasse von Proteinen, bekannt als „akute Phase Reagenzien“, zu synthetisieren, und sie wirken auf den Hypothalamus als Pyrogene. Auf Grund dieser Aktivitäten wurde gesehen, daß TNFs eine wichtige Rolle in der Antwort eines Organismus auf Stress, Infektion und Verletzung spielen. Siehe z. B. Artikel von P. J. Selby et al. in Lancet Febr. 27, 1988, S. 483; H. F. Starness, Jr. et al. in J. Clin. Invest. 82, 1321 (1988); A. Oliff et al. in Cell 50:555 (1987); und A. Waage et al. in Lancet, Febr. 14, 1987, S. 355.

Jedoch kamen trotz ihrer normalerweise vorteilhaften Wirkungen Umstände zutage, bei denen die Wirkungen von TNFs schädlich sind. Zum Beispiel verursacht in Tiere injiziertes TNF alpha die Symptome des septischen Schockes, es wurde beobachtet, daß endogene TNF-Spiegel ansteigen, folgend auf Injektion von Bakterien oder Bakterienzellwänden. TNFs verursachen auch Darmnekrose und akute Lungenverletzungen (acute lung injury), und sie stimulieren den Katabolismus von Muskelprotein.

Zusätzlich könnte die Fähigkeit von TNFs, die Spiegel an Kollagenase in Gelenken zu erhöhen und die Chemotaxis und Wanderung von Leukozyten und Lymphozyten zu leiten, auch den Abbau von Knorpel und die Proliferation von Synovialgewebe bei dieser Krankheit verantwortlich sein. Deshalb könnten TNFs als Mediatoren der akuten und chronischen Phasen der Immunpathologie bei rheumatoider Arthritis dienen. TNFs könnten auch für einige Störungen der Blutgerinnung verantwortlich sein durch Ändern der Funktion endothelialer Zellen. Zudem wurde überschüssige TNF-Produktion in Patienten mit AIDS gezeigt, und dies könnte verantwortlich sein für einen Teil des Fiebers, der akuten Phasenantwort und der Cachexie, die bei dieser Krankheit und Leukämien beobachtet wird.

Bei diesen und anderen Umständen, bei denen TNF einen schädlichen Effekt hat, besteht eindeutig ein klinischer Nutzen eines Inhibitors der TNF-Wirkung.

Systematisch verabreicht wären TNF-Inhibitoren nützliche Therapeutika gegen septischen Schock und Cachexie. Lokal verabreicht würden solche TNF-Inhibitoren dazu dienen, Gewebeerstörung in entzündeten Gelenken und anderen Entzündungsstellen zu verhindern. Tatsächlich könnten solche TNF-Inhibitoren noch wirksamer sein, wenn sie in Verbindung mit Interleukin-1-(IL-1)-Inhibitoren verabreicht würden.

Eine Möglichkeit für einen therapeutischen Eingriff gegen die Wirkung von TNF besteht auf der Ebene der Antwort der Zielzelle auf das Protein. TNF scheint auf Zellen auf einem klassischen rezeptorvermittelten Weg zu wirken. Somit würde jedes Molekül, das die Fähigkeit von TNF an seine Rezeptoren zu binden stört, entweder durch Blockieren des Rezeptors oder durch Blockieren des TNF, die TNF-Wirkung regulieren. Aus diesen Gründen wurde nach Proteinen und kleinen Molekülen, die auf diese Weise in der Lage sind, TNF zu inhibieren, durch die gegenwärtigen Erfinder gesucht.

Die Aufgabe der Erfindung besteht in folgendem:

- gereinigte Formen von TNF-Inhibitor, die gegenüber TNF alpha aktiv sind, zur Verfügung zu stellen und diese Inhibitoren in gereinigter Form zur Verfügung zu stellen, um die Bestimmung ihrer Aminosäuresequenz zu ermöglichen,
- die Aminosäuresequenz bestimmter TNF-Inhibitoren zur Verfügung zu stellen,
- eine zelluläre Quelle für die mRNA, codierend für TNF-Inhibitoren und eine cDNA-Bank, enthaltend eine cDNA für die Inhibitoren, zur Verfügung zu stellen,
- einen genomischen Klon an DNA, codierend für den TNF-Inhibitor, und die codierenden Sequenzen dieser DNA, zur Verfügung zu stellen,
- die Identifizierung von biologisch aktiven Analogen solcher TNF-Inhibitoren mit verstärkten oder gleichwertigen Eigenschaften,
- ein rekombinantes DNA-System für die Herstellung des TNF-Inhibitors zur Verfügung zu stellen,
- gereinigte Formen von TNF zur Verfügung zu stellen, die als pharmazeutische Präparate, die Aktivität gegen TNF entfalten, angewendet werden könnten,
- gereinigte Kombinationen von TNF-Inhibitoren und IL-1-Inhibitoren zur Verfügung zu stellen, die als pharmazeutische Präparate, die Aktivität gegen IL-1 und TNF entfalten, angewendet werden können.

Es wurde ein beträchtlich gereinigter Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Inhibitor, der gegen TNF aktiv ist, gefunden.

Es wurden mindestens zwei TNF-Inhibitorproteine mit TNF-inhibierenden Eigenschaften isoliert. Ein 30kDa Protein und ein 40kDa Protein wurden in ihrer gereinigten Form erhalten. Die Aminosäuresequenz des 30kDa TNF-Inhibitorproteins ist erhalten worden. Die Aminosäuresequenzdaten des 40kDa-Inhibitorproteins sind ebenfalls erhalten worden. Beide, der 30kDa TNF-Inhibitor und der 40kDa TNF-Inhibitor sind neue, zuvor nicht beschriebene Proteine.

Der 30kDa TNF-Inhibitor kann deglycolysiert sein und hat ein Molekulargewicht von ungefähr 18kDa.

Der TNF-Inhibitor ist durch rekombinante DNA-Methoden hergestellt. Der kDa-Inhibitor kann ebenfalls deglycolysiert sein. Der 30kDa TNF-Inhibitor besitzt die in Fig. 19 gezeigte Aminosäuresequenz. Der 40kDa TNF-Inhibitor besitzt die in Fig. 38 gezeigte Aminosäuresequenz.

Der TNF-Inhibitor 40kDa ist TNF-Inhibitor Δ51 und Δ53.

Das erfindungsgemäße Verfahren ist eine rekombinante DNA-Methode zur Herstellung eines TNF-Inhibitors und umfaßt folgende Verfahrensschritte:

- (a) Herstellung einer DNA-Sequenz, die eine Wirtszelle dahin lenken kann, ein Protein mit TNF-Inhibitoraktivitäten herzustellen;
- (b) Klonieren der DNA-Sequenz in einen Vektor, der in eine ganze Zelle transferiert und dort repliziert werden kann, wobei der Vektor zum Expressieren der DNA-Sequenz benötigte Funktionselemente enthält;

- (c) Transferieren des Vektors, enthaltend die synthetische DNA-Sequenz und Funktionselemente, in einen Wirt, der die den TNF-Inhibitor codierende DNA exprimieren kann;
- (d) Kultivieren der Wirtszellen unter Bedingungen, die geeignet sind, den Vektor zu amplifizieren und den Inhibitor zu exprimieren;
- (e) Ernten des Inhibitors; und
- (f) dem Inhibitor ermöglichen, eine aktive Tertiärstruktur anzunehmen, wodurch er TNF-Inhibitoraktivität besitzt.

Bei diesem Verfahren ist der TNF-Inhibitor 30kDa oder der TNF-Inhibitor 40kDa TNF-Inhibitor.

Der TNF-Inhibitor 40kDa ist TNF-Inhibitor $\Delta 51$ und der TNF-Inhibitor 40kDa ist TNF-Inhibitor $\Delta 53$.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Gen, das für Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Inhibitor codiert.

Bei diesem Gen ist der TNF-Inhibitor ein 30kDa TNF-Inhibitor oder ein reifer 40kDa-Inhibitor.

Der TNF-Inhibitor 40kDa ist TNF-Inhibitor $\Delta 51$ oder TNF-Inhibitor $\Delta 53$.

Ein menschlicher genomischer DNA-Klon, der das Gen für das 30kDa Protein enthält, ist erhalten worden. Eine Zellquelle für dieses Protein ist identifiziert ein cDNA-Klon erhalten worden, und die Nukleinsäuresequenz des Gens für das Protein ist bestimmt worden.

Zusätzlich ist der Genklon in einen Vektor eingefügt worden, von dem gefunden wurde, daß er das Protein in Wirtszellen exprimiert. Es wurde auch ein Verfahren entwickelt, um das Protein in einer aktiven Form zu reinigen.

Eine Zellquelle ist identifiziert worden, die das 40kDa Protein produziert, und es ist ein cDNA-Klon erhalten worden, und die Nukleinsäuresequenz des Gens für das 40kDa Protein ist bestimmt worden. Die vollständigen cDNA-Klone, die für beide, den 30kDa TNF-Inhibitorvorläufer und den 40kDa TNF-Inhibitorvorläufer codieren, sind in Säugerzellen exprimiert worden, um eine Zunahme an TNF-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche zu erzielen.

Ein Gen, codierend für die reife Form des 30kDa Proteins, ist in E. Coli exprimiert worden. Drei getrennte Gene, codierend für das Ganze oder Teile des reifen 40kDa Proteins sind auch in E. Coli exprimiert worden. Die drei exprimierten 40kDa Inhibitorproteine – reifer 40kDa TNF-Inhibitor, 40kDa TNF-Inhibitor $\Delta 51$ und 40kDa TNF-Inhibitor $\Delta 53$ – besitzen jeweils TNF-inhibierende Aktivität.

Reifer TNF-Inhibitor, wie aus dem durch menschliche U937 Zellen konditioniertem Medium isoliert, und 40kDa TNF-Inhibitor $\Delta 51$ und 40kDa TNF-Inhibitor $\Delta 53$ werden gemeinsam als 40kDa TNF-Inhibitor bezeichnet.

Der 30kDa TNF-Inhibitor hat TNF alpha-inhibierende Aktivität gezeigt. Der 40kDa TNF-Inhibitor hat inhibierende Wirkung gegen beide TNF alpha und TNF beta, gezeigt.

Es wird nun möglich sein, die Herstellung dieser TNF-Inhibitoren im großen Maßstab durch rekombinante DNA-Technologie durchzuführen. Diese Inhibitoren sollten zur Verwendung in pharmazeutischen Formulierungen geeignet sein, die zur Behandlung pathophysiologischer Zustände, welche durch TNF vermittelt sind, nützlich sind.

Die Erfindung soll nachstehend an mehreren Beispielen erläutert werden.

- Fig. 1: zeigt einen Cytotoxizitätstest für TNF in der Abwesenheit (-.-) und in der Abwesenheit (-x-x) von TNF-Inhibitor (30kDa). Verschiedene Konzentrationen an TNF wurden mit und ohne TNF-Inhibitor (30kDa) inkubiert, und der Cytotoxizitätstests wurde, wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.
- Fig. 2: zeigt einen nativen Gelshift-Assay, bei dem „a“ TNF alleine darstellt, und „b“ stellt TNF + TNF-Inhibitor (30kDa) dar.
- Fig. 3: zeigt Con A-Peroxidase-Färbung von TNF-Inhibitor (30kDa). Ungefähr 200 ng eines jeden Proteins wurden auf 14% SDS-PAGE laufengelassen und auf Nitrozellulosefilter transferiert. Glycoproteine wurden unter Verwendung von Con A-Peroxidase-Färbung identifiziert. In dieser Figur stellt „a“ einen Molekulargewichtsmarker dar, „b“ stellt Ovalbumin dar, „c“ stellt Rinderserumalbumin dar, und „d“ stellt TNF-Inhibitor (30kDa) dar.
- Fig. 4: zeigt die chemische Deglycosylierung von TNF-Inhibitor. Ungefähr 200 ng an TNF-Inhibitor 30kDa wurden chemisch deglycosyliert (Spur C), wie in Beispiel 1 beschrieben.
- Fig. 5: zeigt eine N-Glycanase-Behandlung von TNF-Inhibitor (30kDa). Gereinigter TNF-Inhibitor (30kDa) wurde jodiert mit Bolton-Hunterreagenz, und denaturierter-jodierter TNF-Inhibitor (30kDa) wurde mit N-Glycanase für 6 Stunden bei 37°C behandelt. In dieser Figur stellt „a“ nativen TNF-Inhibitor (30kDa) dar, und „b“ stellt deglycosylierten, TNF-Inhibitor (30kDa) dar.
- Fig. 6A: zeigt ein OD₂₈₀-Profil der DEAE-Sepharose CL-6B Chromatographie von 20l Harn dar.
- Fig. 6B: zeigt ein Autoradiogramm des dazugehörigen nativen Gel-Shift-Assays, das einen Peak an TNF-Inhibitor (30kDa) in Fraktionen 57–63, was ungefähr bei 80 mM NaCl ist, anzeigt.
- Fig. 7: zeigt ein OD₂₈₀-Profil der Elution mit 0,05 M Na Phosphat pH 2,5 von der TNF-Affinitätssäule.
- Fig. 8A u. 8B: zeigen Chromatographieprofile (OD₂₁₅ und OD₂₈₀) der RP8-Reinigung des TNF-Inhibitors (30kDa) mit dem L929-Bioassay der Fraktionen von der RP8-Säule, das einen Peak an TNF-Inhibitor (30kDa) bei Fraktionen 28–31 zeigt, was ungefähr 18% Acetonitril entspricht und bei Fraktionen 35 und 36, was ungefähr 21% Acetonitril entspricht.
- Fig. 8B: zeigt eine silbergefärbte 15% SDS-PAGE des RP89-Pools, die eine einzelne Bande bei 30kDa zeigt.
- Fig. 9A: zeigt eine Peptid-Reinigung eines Lys-C-Verdaus von TNF-Inhibitor (30kDa).
- Fig. 9B: zeigt eine Peptid-Reinigung alkylierter (*) Lys-C-Verdaue von TNF-Inhibitor (30kDa).
- Fig. 10: zeigt eine Peptid-Reinigung zweier alkylierter (*) Asp-N-Verdaue von TNF-Inhibitor (30kDa).
- Fig. 11A u. 11B: zeigen Peptid-Reinigungen eines Endopeptidase V8-Verdaus von reduziertem carboxymethyliertem TNF-Inhibitor (30kDa).
- Fig. 12: zeigt Aminosäuresequenzen, die in TNF-Inhibitor (30kDa) vorkommen. Lücken in der Sequenz geben an, daß der Rest nicht eindeutig durch Proteinsequenzierung identifiziert worden ist. C* zeigt die Identifizierung von Carboxymethylcystein durch die Anwesenheit von ³H in dem Rest an.
- Fig. 13: zeigt die DNA-Sequenz eines genomischen Klons, codierend für mindestens einen Teil eines TNF-Inhibitors (30kDa).

- Fig. 14: zeigt mindestens 70% der reifen Aminosäuresequenz eines bevorzugten TNF-Inhibitors.
 Fig. 15: zeigt den Nachweis von TNF-Inhibitor in U937-Überstand durch den Gelshift-Assay.
 Fig. 16: zeigt den Nachweis von TNF-Inhibitor in HPLC-Fractionen von U937-Überstand.
 Fig. 17: zeigt den Northern Blot gemäß Beispiel 4.
 Fig. 18: zeigt den deglycosylierten TNF-Inhibitor (30kDa) bindend an TNF. Glycosylierter und deglycosylierter TNF-Inhibitor wurde mit TNF-Affigel inkubiert und Durchlaufmaterialien und Eluate des Gels wurden auf SDS-PAGE analysiert. In dieser Figur gibt (11) den Durchlauf von TNF-INH, reduziert und oxidiert, an, (21) gibt den Durchlauf von deglycosyliertem TNF-INH, reduziert und oxidiert, an, (51) gibt den Durchlauf von nativem TNF-INH an, (12) gibt das Eluat von TNF-INH, reduziert und oxidiert, an, (22) gibt das Eluat von deglycosyliertem TNF-INH, reduziert und oxidiert, an, und (52) gibt das Eluat von nativem TNF-INH an.
 Fig. 19: zeigt die komplette Aminosäuresequenz des 30 kDa TNF-Inhibitors.
 Fig. 20: zeigt die cDNA-Sequenz, codierend die in Fig. 19 gezeigte Aminosäuresequenz.
 Fig. 21: zeigt die gesamte cDNA-Sequenz für den Vorläufer des 30 kDa TNF-Inhibitors.
 Fig. 22: zeigt die DNA-Sequenz nahe dem Start des TNF-Inhibitorgens (30 kDa) im Plasmid pTNFIX-1.
 Fig. 23: zeigt das Plasmid pCMVXV beta TNFBP stop A.
 Fig. 24: zeigt das Plasmid pSVXTNFBP stop A.
 Fig. 25: zeigt ein Chromatographieprofil OD₂₁₅ der RP8-Säule des 30 kDa TNF-Inhibitors von E. Coli. Die L929-Bioassayergebnisse sind auch gezeigt (-x-x).
 Fig. 26: zeigt eine silbergefärbte 14% SDS-PAGE der RP8-Fractionen in Fig. 25.
 Fig. 27: zeigt ein Chromatographieprofil OD₂₁₅ der RP8-Reinigung des TNF-Inhibitors von U937-Zellen. Die L929-Bioassayergebnisse sind auch gezeigt als Balkendiagramm. Zwei getrennte TNF-Inhibitorpeaks sind erkennbar.
 Fig. 28: zeigt eine silbergefärbte 14% SDS-PAGE der RP8-Fractionen. Fraktion Nummer 30 enthält den 30 kDa TNF-Inhibitor, und Fraktion Nummer 35 enthält den 40 kDa TNF-Inhibitor.
 Fig. 29: zeigt ein Chromatographieprofil OD₂₁₅ der Reinigung von 40 kDa TNF-Inhibitor aus Harn. Der zweite TNF-Inhibitorpeak von mehreren RP8-Chromatographien wurde kombiniert und erneut analysiert auf einer RP8-Säule. TNF-inhibierende Aktivität wird als Balkendiagramm gezeigt. Der Unterschied zwischen dem OD₂₁₅-Peak und dem Aktivitätspeak spiegelt das Totvolumen zwischen dem Detektor und dem Fraktionssammler wider.
 Fig. 30: zeigt eine silbergefärbte 14% SDS-PAGE der RP8-Fractionen aus Harn. Fraktion Nummer 32 enthält den 40 kDa TNF-Inhibitor.
 Fig. 31: zeigt die aminoterminalen Sequenzen von Inhibitoren stammend von U937 (30 kDa und 40 kDa) und 40 kDa TNF-Inhibitor stammend aus Harn.
 Fig. 32: zeigt eine Peptidreinigung von Endopeptidase V8-verdaulichem 40 kDa TNF-Inhibitor.
 Fig. 33: zeigt eine Peptidreinigung von Endopeptidasen Arg-C-verdaulichem 40 kDa TNF-Inhibitor.
 Fig. 34: zeigt eine Peptidreinigung von Trypsin verdaulichem Arg-C 16-Peptid.
 Fig. 35: zeigt eine Peptidreinigung von Chymotrypsin verdaulichem Arg-C 10-Peptid.
 Fig. 36: zeigt eine Primärstruktur des 40 kDa TNF-Inhibitors.
 Fig. 37: zeigt einen Teil der 40 kDa TNF-Inhibitor cDNA-Sequenz zusammen mit dem vorhergesagten Aminosäure-Translationsprodukt.
 Fig. 38: zeigt die komplette Aminosäuresequenz des 40 kDa TNF-Inhibitors.
 Fig. 39: zeigt die gesamte cDNA-Sequenz für den Vorläufer des 40 kDa TNF-Inhibitors zusammen mit seinem zu folgernden Translationsprodukt.
 Fig. 40: zeigt einen Cytotoxizitätstest für TNF beta (Lymphotoxin) bei Anwesenheit (o-o) von 40 kDa TNF-Inhibitor bei Anwesenheit (•-•) von 30 kDa TNF-Inhibitor und ohne jeglichen Inhibitor (x-x).
 Fig. 41: zeigt die Expression der in Fig. 21 gezeigten 30 kDa TNF-Inhibitor cDNA-Sequenz in COS7-Zellen. COS-Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert unter Verwendung der Lipofectionmethode von Feigner et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. [USA] 84, 7413-1987). $3,4 \times 10^5$ -Zellen wurden mit der angegebenen Menge an (¹²⁵I) TNFα mit einer spezifischen Aktivität von $5,6 \times 10^4$ cpm/ng inkubiert und die an die Zellen gebundene Menge bestimmt. Offene Zeichen sind die gesamten cpm, die mit Zellen nach 4 Stunden Inkubation bei 4°C assoziiert sind. Ausgefüllte Zeichen stellen gebundenen (¹²⁵I) TNFα bei Anwesenheit eines 180fachen Überschusses an kaltem unmarkiertem TNFα dar.
 Fig. 42: zeigt die Expression der in Fig. 39 gezeigten 40 kDa TNF-Inhibitor cDNA-Sequenz in COS7. Assaybedingungen waren wie in Fig. 41 beschrieben. Die ausgefüllten Zeichen stellen gebundenen (¹²⁵I) TNFα in Anwesenheit eines 180fachen Überschusses an kaltem unmarkiertem TNFα dar.
 Fig. 43: zeigt den Cytotoxizitäts-Test einer HPLC RPC-8-Fraktion menschlicher Monozyten, die mit PMA und PHA für 24 Stunden behandelt wurden.
 Fig. 44: zeigt das RPC-8 chromatographische Muster von 40 kDa TNF-Inhibitor Δ51 (17), die SDS-Polyacrylamidgelanalyse der Fraktionen (B) und den Cytotoxizitäts-Test auf L929-Zellen (C).
 Fig. 45: zeigt das RPC-8 chromatographische Muster von 40 kDa TNF-Inhibitor Δ53 (A), die SDS-Polyacrylamidgelanalyse der Fraktionen (B) und den Cytotoxizitäts-Test auf L929-Zellen (C).

Im folgenden werden ausführlich gegenwärtig bevorzugte Ausführungsformen der Erfindung erwähnt, die zusammen mit den folgenden Beispielen dazu dienen, die Prinzipien der Erfindung zu erklären.

1. Inhibitor, isoliert aus Harn

Wie oben erwähnt, betrifft die vorliegende Erfindung TNF-Inhibitoren, die in gereinigter Form isoliert worden sind. Bei einer Ausführungsform dieser Erfindung stammen die TNF-Inhibitoren vorzugsweise aus Harn. Zusätzlich umfaßt die Erfindung beträchtlich gereinigte TNF-Inhibitoren jeglichen Ursprungs, die biologisch äquivalent zu den Inhibitoren isoliert aus Harn sind. Überall in dieser Beschreibung sollte jede Bezugnahme auf einen TNF-Inhibitor oder einfach einen Inhibitor aufgefaßt werden als Bezug auf jeden der identifizierten Inhibitoren und hierin beschrieben.

Unter „biologisch äquivalent“, wie es überall in der Beschreibung und den Ansprüchen verwendet wird, verstehen wir Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung, die in der Lage sind, TNF-Wirkungen in einer ähnlichen Weise, aber nicht notwendigerweise in gleichem Ausmaß wie der native aus Urin isolierte TNF-Inhibitor, zu verhindern. Unter „beträchtlich homolog“, wie es überall in der folgenden Beschreibung und Ansprüchen verwendet wird, wird ein Grad an Homologie zu dem nativen aus Harn isolierten TNF-Inhibitor verstanden, der den von jedem zuvor berichteten TNF-Inhibitor gezeigten Grad übersteigt. Vorzugsweise übersteigt der Grad an Homologie 70%, besonders bevorzugt übersteigt er 80%, und ganz besonders bevorzugt übersteigt er 90%, 95% oder 99%. Eine speziell bevorzugte Gruppe von TNF-Inhibitoren sind über 95% homolog mit dem nativen Inhibitor. Der Prozentsatz an Homologie, wie hierin beschrieben, wird berechnet als der Prozentsatz an Aminosäureresten, die in der kleineren der zwei Sequenzen gefunden werden, die ausgerichtet sind auf identische Aminosäurereste in der zu vergleichenden Sequenz, wenn vier Lücken in einer Länge von 100 Aminosäuren eingefügt werden können, um die Ausrichtung (alignment) zu unterstützen, wie von Dayhoff dargelegt, in *Atlas of Protein Sequence and Structure*, Vol. 5, S. 124 (1972), National Biochemical Research Foundation, Washington, D. C., was ausdrücklich durch den Verweis hierin aufgenommen wird. Auch als beträchtlich homolog eingeschlossen sind solche TNF-Inhibitoren, die vielleicht aufgrund von Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen die beschriebenen Inhibitoren isoliert werden, oder deren Gene vielleicht durch Hybridisierung mit den Genen oder mit Segmenten der beschriebenen Inhibitoren isoliert werden. Die bevorzugten TNF-Inhibitoren der vorliegenden Erfindung wurden aus Harn erhalten und zum erstenmal in einer gereinigten Form isoliert. Für die Zwecke der vorliegenden Anmeldung soll „reine Form“ oder „gereinigte Form“ bedeuten, wenn damit auf hierin offenbarte TNF-Inhibitoren hingewiesen wird, eine Präparation, die im wesentlichen frei von Proteinen ist, die nicht TNF-Inhibitorproteine sind. Vorzugsweise sind die TNF-Inhibitoren der vorliegenden Erfindung zu mindestens 50% rein, vorzugsweise 75% rein und besonders bevorzugt 80%, 95% oder 99% rein. In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die TNF-Inhibitorproteinpräparation ausreichend rein, um es einem Fachmann zu ermöglichen, dessen Aminosäuresequenz zu bestimmen, ohne vorher weitere Reinigungsschritte auszuführen.

Mindestens zwei Inhibitoren sind mit den in den Beispielen dargelegten Methoden isoliert worden. Die zwei Inhibitoren sind ungefähr 30 kDa und ungefähr 40 kDa Moleküle auf SDS-PAGE. Der 30 kDa-Inhibitor eluiert von einer DEAE CL6B-Säule bei ungefähr 80 mM NaCl in Tris-Puffer, pH 7,5. Die Aminosäuresequenz des 30 kDa Inhibitors ist in Fig. 19 dargelegt, und die Aminosäuresequenz des 40 kDa Inhibitors ist in Fig. 38 dargelegt. Von dem 30 kDa TNF-Inhibitor ist gezeigt worden, daß er die Aktivität von TNF alpha inhibiert, und daß er keinen Effekt auf die Aktivität von TNF beta hat. Von dem 40 kDa TNF-Inhibitor ist gezeigt worden, daß er einen bedeutenden inhibierenden Effekt gegen beide, TNF alpha und TNF beta (Lymphotoxin), besitzt.

2. Inhibitor, isoliert aus U937konditioniertem Medium

Bei einer alternativen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung sind TNF-Inhibitoren aus einem Medium, konditioniert mit menschlichen U937 Zellen, isoliert worden. Zwei TNF-Inhibitorproteine sind identifiziert und aus diesem konditionierten Medium isoliert worden. Die zwei TNF-Inhibitoren sind 30 kDa und 40 kDa Proteine, die beträchtlich homolog zu den 30 kDa und 40 kDa TNF-Inhibitoren isoliert aus Harn sind, und sind biologisch äquivalent zu solchen Proteinen.

3. Struktur des 30 kDa TNF-Inhibitors

Der aus Harn isolierte 30 kDa TNF-Inhibitor ist ein Glycoprotein, das mindestens einen Kohlenhydratanteil enthält. In einer Ausführungsform dieser Erfindung ist der natürliche 30 kDa TNF-Inhibitor deglycosyliert. Der deglycosylierte TNF-Inhibitor, der seine Fähigkeit, TNF zu binden, beibehält, liegt im Bereich der vorliegenden Erfindung. Vollständig und partiell deglycosylierter 30 kDa TNF-Inhibitor wird von dieser Erfindung umfaßt. Der aus Harn isolierte deglycosylierte 30 kDa TNF-Inhibitor ist ein ungefähr 18 kDa Protein.

Die identifizierte Gensequenz, die das 30 kDa Protein codiert, enthält kein Terminationscodon, wie das für die Aminosäuresequenz des 18 kDa Proteins zu erwarten wäre. Die Erfinder theoretisieren, aber sind keinesfalls durch diese Theorie limitiert, daß die in vivo produzierten Proteine zusätzliche Aminosäuresequenzen enthalten. Gemäß dieser Theorie ist das codierte Protein ein TNF-Rezeptormolekül. Das durch die cDNA codierte Inhibitorprotein hat eine hydrophobe Sequenz, die mit der sich durch die Zellmembran erstreckende Region vereinbar wäre, und einen TNF bindenden Anteil, der sich extrazellulär von der Zellmembran erstrecken würde. In Einklang mit dieser Hypothese und wie in Beispiel 19 beschrieben, ist die cDNA in COS-Zellen exprimiert worden und führt zu einer Zunahme in der Anzahl an TNF-Bindungsstellen auf der Zelle. Die TNF-Inhibitoren der vorliegenden Erfindung sind deshalb die Rezeptorfragmente oder Anteile des Rezeptormoleküls. Solche bindenden Fragmente sind in bezug auf andere Bindungs-/Inhibitor-Moleküle (z.B. IL-2-Inhibitor) identifiziert worden und werden als lösliche Rezeptoren bezeichnet.

Diese Theorie stimmt mit dem Fehlen eines Terminationscodons überein, das dem Ende des Proteins, wie aus der bekannten Sequenz des isolierten TNF-Inhibitorfaktors angenommen, entsprechend würde. Sie stimmt auch mit der Tatsache überein, daß die Nukleotidsequenz an der Stelle, wo das Terminationscodon zu finden sein müßte, eine Reihe von hydrophoben Aminosäuren codiert.

Die vorliegende Erfindung umfaßt deshalb nicht nur den identifizierten und beschriebenen Anteil der TNF-Inhibitoren, sondern alle Proteine, die irgendeinen Anteil der Aminosäuresequenz, die durch die identifizierten und hierin beschriebenen cDNA-Sequenzen codiert werden, enthalten.

4. Struktur des 40kDa TNF-Inhibitors

Der aus mit menschlichen U937-Zellen konditioniertem Medium isolierte 40kDa TNF-Inhibitor und in Harn identifiziert ist ein Glycoprotein, das mindestens einen Kohlenhydratanteil enthält. In einer Ausführungsform dieser Erfindung ist der natürliche 40kDa TNF-Inhibitor deglycosyliert. Der deglycosylierte 40kDa TNF-Inhibitor, der seine Fähigkeit, an beide, TNF alpha und TNF beta (Lymphotoxin), zu binden, beibehält, liegt im Bereich der vorliegenden Erfindung.

Vollständig und teilweise deglycosylierter 40kDa TNF-Inhibitor wird von dieser Erfindung umfaßt. Die Erfinder theoretisieren, daß der 40kDa Inhibitor auch ein löslicher Rezeptor sein könnte. Die identifizierte Gensequenz, die das 40kDa Protein codiert, enthält kein Terminationscodon, wie das von der Aminosäuresequenz des deglycosylierten 40kDa TNF-Inhibitors zu erwarten gewesen wäre. Wie in Beispiel 20 beschrieben, ist die cDNA in COS-Zellen exprimiert worden und führt zu einer Zunahme in der Anzahl an TNF-Bindungsstellen auf der Zelle.

Die vorliegende Erfindung umfaßt das Gen, das das aus mit menschlichen U937-Zellen konditioniertem Medium isolierte 40kDa Protein und in Harn identifiziert codiert, und größere und kleinere Anteile eines solchen Gens bis zu dem Ausmaß, das die TNF-inhibierende Aktivität des codierten Proteins nicht beeinflußt wird. Wie aus Fig. 38 ersichtlich, besitzt der reife 40kDa TNF-Inhibitor eine prolinreiche Region nahe des zu erwartenden C-Terminus des Proteins. 40kDa TNF-Inhibitoren, bei denen das ganze oder Teile des prolinreichen Musters nicht in dem Protein enthalten sind, sind als TNF-Inhibitoren aktiv und liegen im Bereich der vorliegenden Erfindung. Zwei solcher verkürzten Proteine sind unten in den Beispielen 17 und 22 beschrieben und werden als 40kDa TNF-Inhibitor Δ51 und 40kDa TNF-Inhibitor Δ53 bezeichnet. Alle Teile dieser Anmeldung, die sich allgemein auf 40kDa TNF-Inhibitor beziehen, sollen das aus mit menschlichen U937-Zellen konditioniertem Medium isolierte und in Harn identifizierte reife 40kDa Protein, wie auch den 40kDa TNF-Inhibitor Δ51 und 40kDa Inhibitor Δ53 umfassen.

Es wird allgemein angenommen, daß mindestens ein TNF-Rezeptor in der Lage ist, beide, TNF alpha und TNF beta, zu binden, während einige TNF-Rezeptoren nur in der Lage sind, TNF alpha zu binden. Dies ist in Übereinstimmung mit den Befunden in der vorliegenden Erfindung, in der zwei TNF-Inhibitoren identifiziert worden sind, für die beide vorgeschlagen wird, daß sie aktive Fragmente von TNF-Rezeptorstellen sind, und daß einer nur aktiv gegen TNF alpha und der andere aktiv gegen beide, TNF alpha und TNF beta, ist.

5. Rekombinanter Inhibitor

(a) Allgemein

Es wird nun eine rekombinante DNA-Methode zur Herstellung eines TNF-Inhibitors offenbart. In einer Ausführungsform der Erfindung funktioniert die aktive Stelle in einer biologisch äquivalenten Weise zu der des aus Harn isolierten TNF-Inhibitors. Eine natürliche oder synthetische DNA-Sequenz kann zur Herstellung solcher TNF-Inhibitoren verwendet werden. Diese Methode umfaßt:

- (a) Herstellung einer DNA-Sequenz, die in der Lage ist, eine Wirtszelle dahinzuleiten, ein Protein mit TNF-Inhibitoraktivität oder einen Vorläufer davon herzustellen;
- (b) Klonieren der DNA-Sequenz in einen Vektor, der in eine Wirtszelle transferiert und repliziert werden kann, wobei der Vektor Funktionselemente enthält, die zum Exprimieren der DNA-Sequenz oder eines Vorläufers, davon benötigt werden;
- (c) Transferieren des Vektors, enthaltend die synthetische DNA-Sequenz und Funktionselemente, in eine Wirtszelle, die die für den TNF-Inhibitor oder einen Vorläufer davon codierende DNA exprimieren kann;
- (d) Kultivieren der Wirtszellen unter Bedingungen zur Amplifikation des Vektors und Expression des Inhibitors oder eines Vorläufers davon;
- (e) Ernten des Inhibitors oder eines Vorläufers davon; und
- (f) dem Inhibitor erlauben, eine aktive Tertiärstruktur anzunehmen, wodurch er TNF-inhibierende Aktivität besitzt, oder er zu einem Protein mit TNF-inhibierender Aktivität prozessiert werden kann.

In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der TNF-Inhibitor durch die Wirtszelle in der Form eines Vorläuferproteins hergestellt. Dieses Vorläuferprotein wird in einem oder mehreren Schritten zu einem Protein prozessiert, und es wird ihm erlaubt, zu einem aktiven Inhibitor korrekt zu falten, unter Verwendung von dem Fachmann allgemein bekannten Methoden.

(b) DNA-Sequenzen

Zur Verwendung in diesen Methoden in Betracht gezogene DNA-Sequenzen werden teilweise in Beispielen 6, 14a und 17 diskutiert. Es wird betrachtet, daß diese Sequenzen synthetische und natürliche DNA-Sequenzen und Kombinationen davon einschließen. Die natürlichen Sequenzen schließen weiterhin cDNA oder genomische DNA-Segmente ein.

Die Mittel zur synthetischen Erzeugung von Polynucleotidsequenzen, codierend ein Protein identisch zu cDNA oder genomischen Polynucleotidsequenzen codiertem Protein, sind dem Fachmann allgemein bekannt, besonders an Betracht der hierin enthaltenen Lehren. Als Beispiel für den gegenwärtigen Stand der Technik, betreffend Polynucleotidsynthese, wird auf Matteucci, M.D., und Caruthers, M.H., in J. Am. Chem. Soc. 103: 3185 (1981) und Beaucage, S.L., und Caruthers, M.H., in Tetrahedron Lett. 12: 1859 (1981) und auf die Anleitungen, die mit einem ABI Oligonucleotid-Synthesizer mitgeliefert werden, hingewiesen, die alle durch darauf hinweisen ausdrücklich hierin eingebaut werden.

Diese synthetischen Sequenzen können identisch zu den unten ausführlicher beschriebenen natürlichen Sequenzen sein, oder sie können verschiedene Nucleotide enthalten. In einer Ausführungsform, wenn die synthetischen Nucleotidsequenzen andere Nucleotide von denen, die in den natürlichen DNA-Sequenzen dieser Erfindung gefunden wurden, enthalten, wird es angesehen, daß diese verschiedenen Sequenzen noch für ein Polypeptid codieren, das dieselbe Primärstruktur wie der aus Harn isolierte TNF-Inhibitor besitzt. Bei einer alternativen Ausführungsform codieren die synthetischen Sequenzen, enthaltend andere Nucleotide, ein Polypeptid, das dieselbe biologische Aktivität wie der hierin beschriebene TNF-Inhibitor besitzt.

Zusätzlich kann die DNA-Sequenz ein Fragment einer natürlichen Sequenz sein, d.h. ein Fragment eines Polynucleotids, das in der Natur vorkam und das zum erstenmal von den gegenwärtigen Erfindern isoliert und gereinigt worden ist. In einer Ausführungsform ist die DNA-Sequenz ein aus einer cDNA-Bank isoliertes Restriktionsfragment.

Bei einer alternativen Ausführungsform wird die DNA-Sequenz aus einer menschlichen genomischen Bank isoliert. Ein Beispiel für eine solche Bank, die bei dieser Ausführungsform nützlich ist, ist von Wyman, et al., (1985) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 82, 2880-2884 dargelegt.

Bei einer bevorzugten Version dieser Ausführungsform wird in Erwägung gezogen, daß die natürliche DNA-Sequenz durch eine Methode erhalten wird, umfassend:

- (a) Herstellung einer menschlichen cDNA-Bank aus Zellen, vorzugsweise U937-Zellen, die einen TNF-Inhibitor herstellen können, in einem Vektor und einer Zelle, die die gesamte oder Teile der cDNA amplifizieren und exprimieren können;
- (b) Absuchen (probing) der menschlichen DNA-Bank mit mindestens einer Probe (probe), die an das TNF-Inhibitor-gen oder sein Proteinprodukt binden kann,
- (c) Identifizieren mindestens eines Klons, der das für den Inhibitor codierende Gen enthält, aufgrund der Fähigkeit des Klons, zumindest eine Probe für das Gen oder sein Proteinprodukt zu binden;
- (d) Isolieren des Gens oder Teilen des Gens, das für den Inhibitor codiert, von dem ausgewählten Klon oder Klonen; und
- (e) Verknüpfen des Gens oder geeigneter Fragmente davon mit Funktionselementen, die nötig sind, um das Gen in einer Wirtszelle zu behalten und zu exprimieren.

Die natürlichen DNA-Sequenzen, die in dem vorgenannten Verfahren nützlich sind, können auch durch eine Methode identifiziert und isoliert werden, umfassend:

- (a) Herstellung einer menschlichen genomischen Bank, vorzugsweise in einem recBC, sbc Wirt, vorzugsweise CES200, vermehrt;
- (b) Absuchen der menschlichen genomischen Bank mit mindestens einer Probe, die an ein TNF-Inhibitor-gen oder sein Proteinprodukt binden kann;
- (c) Identifizieren von mindestens einem Klon, der das für den Inhibitor codierende Gen enthält, aufgrund der Fähigkeit des Klons, zumindest eine Probe für das Gen oder sein Proteinprodukt zu binden;
- (d) Isolieren des Gens, das für den Inhibitor codiert, aus dem identifizierten Klon oder Klonen; und
- (e) Verknüpfen des Gens oder geeigneter Fragmente davon mit Funktionselementen, um das Gen in einer Wirtszelle zu behalten und zu exprimieren.

Eine dritte potentielle Methode zur Identifizierung und Isolierung natürlicher DNA-Sequenzen, die in dem vorgenannten Verfahren nützlich sind, umfaßt die folgenden Schritte:

- (a) Herstellung von mRNA aus Zellen, die den TNF-Inhibitor produzieren;
- (b) Synthetisieren von cDNA (einzeln- oder doppelsträngig) von dieser mRNA;
- (c) Amplifizieren der in dieser Mischung von cDNA vorhandenen TNF-Inhibitor spezifischen DNA-Sequenzen unter Verwendung des Polymerase-Kettenreaktion-Verfahrens (polymerase chain reaction; PCR) mit solchen Primer, wie in Tabelle 5 gezeigt;
- (d) Identifizieren der PCR-Produkte, die in den anderen Oligonucleotidproben vorhandenen Sequenzen, wie in Tabelle 5 gezeigt, enthalten, unter Verwendung der Southern-Blot-Analyse;
- (e) Subklonieren der so identifizierten DNA-Fragmente in M13-Vektoren, die das direkte Sequenzieren der DNA-Sequenzen erlauben;
- (f) Verwenden dieser Sequenzen zum Isolieren eines cDNA-Klons von einer cDNA-Bank; und
- (g) Verknüpfen des Gens oder geeigneter Fragmente davon mit Funktionselementen, die nötig sind, um das Gen in Wirtszellen zu behalten und zu exprimieren.

Zum Isolieren einer DNA-Sequenz, die zum Verwenden in obiger Methode geeignet ist, ist es bevorzugt, die zwei Restriktionsspalstellen zu erkennen, die innerhalb und am nächsten zu dem Endteil des geeigneten Gens oder Abschnitts des Gens, das für das native Protein oder Fragmente davon codiert, lokalisiert sind. Das DNA-Segment, das das geeignete Gen oder Abschnitte des Gens enthält, wird dann von dem Rest des genomischen Materials entfernt unter Verwendung geeigneter Restriktionsendonucleasen. Nach dem Herausschneiden werden die 3'- und 5'-Enden der DNA-Sequenz und alle Intron-Exon-Verknüpfungen rekonstruiert, um geeignete DNA-Sequenzen zur Verfügung zu stellen, die für die N- und C-Termini und den Körper des TNF-Inhibitorproteins codieren können und die an ihre Funktionselemente fusioniert werden können.

Wie unten in Beispiel 17 beschrieben, kann die zur Expression des 40kDa TNF-Inhibitors verwendete DNA-Sequenz modifiziert werden, durch die Entfernung von entweder 153 oder 159 Basenpaaren aus dem Gen, das codiert für den reifen 40-kDa-TNF-Inhibitor, der aus mit menschlichen U937-Zellen konditioniertem Medium isoliert und im Harn identifiziert wurde. Das $\Delta 53$ -Gen wurde hergestellt, um das Prolin-Muster von dem C-Terminus des vollständigen Gens zu entfernen, und das $\Delta 51$ -Gen wurde hergestellt, um dem C-Terminus des Gens, das für den 30kDa TNF-Inhibitor codiert, in etwa zu entsprechen.

Eine cDNA-Sequenz, die gemäß dieser Methode aus einer cDNA-Bank isoliert wurde und die zumindest einen Teil des hierin beschriebenen 30kDa TNF-Inhibitors codiert, ist bei der American Type Culture Collection, Rockville, M.D., unter der Accession No. 40645 hinterlegt worden.

Eine DNA-Sequenz, die gemäß dieser Methoden aus einer menschlichen genomischen DNA-Bank isoliert wurde und die für mindestens einen Teil des hierin beschriebenen 30 kDa TNF-Inhibitors codiert, ist bei der American Type Culture Collection, Rockville, M.D., unter der Accession No. 40620 hinterlegt worden.

Eine DNA-Sequenz, die gemäß dieser Methoden aus einer cDNA-Bank isoliert wurde und die für mindestens einen Teil des hierin beschriebenen 40kDa TNF-Inhibitors codiert, ist bei der American Type Culture Collection, Rockville, M.D., unter der Accession No. 68204 hinterlegt worden.

6. Vektoren

(b) Mikroorganismen, speziell E. coli

Die für die Verwendung in der vorliegenden Erfindung in Erwägung zu ziehenden Vektoren umfassen alle Vektoren, in die eine DNA-Sequenz, wie oben diskutiert, inseriert werden kann, zusammen mit allen bevorzugten oder benötigten Funktionselementen, und ein solcher Vektor dann anschließend in eine Wirtszelle transferiert werden kann und in einer solchen

Zelle replizieren kann. Bevorzugte Vektoren sind solche, deren Restriktionsspaltstellen gut dokumentiert worden sind, und die für die Transkription der DNA-Sequenz bevorzugte oder benötigte Funktionselemente enthalten. Jedoch werden auch bestimmte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ins Auge gefaßt, die gegenwärtig nicht entdeckte Vektoren verwenden, die eine oder mehrere der hierin beschriebenen cDNA-Sequenzen enthalten würden. Besonders ist es bevorzugt, daß alle diese Vektoren einige oder alle der folgenden Eigenschaften besitzen: (1) besitzt eine minimale Anzahl von Sequenzen des Wirtsorganismus; (2) wird in dem gewünschten Wirt stabil beibehalten und vermehrt; (3) kann in einer hohen Kopienzahl in dem gewünschten Wirt vorkommen; (4) besitzt einen regulierbaren Promotor, der so positioniert ist, damit er die Transkription des Gens des Interesses fördert; (5) hat mindestens eine Marker DNA-Sequenz, die für eine selektierbare Eigenschaft codiert und die in einem Teil des Plasmids vorhanden ist, der von der Stelle, an der die DNA-Sequenz inseriert wird, getrennt ist; und (6) eine DNA-Sequenz, die die Transkription beenden kann.

In verschiedenen bevorzugten Ausführungsformen enthalten diese Klonierungsvektoren, die die DNA-Sequenzen der vorliegenden Erfindung enthalten und exprimieren können, verschiedene Funktionselemente. Diese „Funktionselemente“ (operational elements), wie hierin erörtert, enthalten mindestens einen Promotor, mindestens eine Shine-Dalgarno-Sequenz, ein Startcodon und mindestens ein Terminationscodon. Vorzugsweise enthalten diese „Funktionselemente“ auch mindestens einen Operator, mindestens eine Leadersequenz für aus dem intrazellulären Raum zu exportierende Proteine, mindestens ein Gen für ein Regulatorprotein und jegliche anderen DNA-Sequenzen, die für angemessene Transkription und anschließende Translation der Vektor-DNA notwendig oder bevorzugt sind.

Bestimmte dieser Funktionselemente können in jedem der bevorzugten Vektoren der vorliegenden Erfindung vorhanden sein. Es wird in Erwägung gezogen, daß jegliche zusätzlichen Funktionselemente, die vielleicht benötigt werden, diesen Vektoren zugefügt werden können unter Verwendung von dem Fachmann bekannten Methoden, besonders in Anbetracht der Lehren hierin.

In der Praxis ist es möglich, jeden dieser Vektoren auf solche Weise zu konstruieren, die es erlaubt, sie einfach zu isolieren, zusammensetzen und auszutauschen. Dies ermöglicht den Zusammenbau zahlreicher funktioneller Gene aus Kombinationen dieser Elemente und der codierenden Region der DNA-Sequenzen. Zusätzlich sind viele dieser Elemente in mehr als einem Wirt anwendbar. Es ist zusätzlich vorauszusehen, daß die Vektoren bei bestimmten bevorzugten Ausführungsformen DNA-Sequenzen enthalten werden, die als Regulatoren („Operatoren“) funktionieren und andere DNA-Sequenzen, die für Regulatorproteine codieren können.

(i) Regulatoren

Diese Regulatoren werden in einer Ausführungsform dazu dienen, die Expression von DNA-Sequenzen in der Anwesenheit von bestimmten Umweltbedingungen zu verhindern und bei der Anwesenheit von anderen Umweltbedingungen, die Transkription und anschließende Expression des durch die DNA-Sequenz codierten Proteins zu erlauben. Es ist besonders bevorzugt, daß regulierende Segmente in den Vektor so inseriert werden, daß die Expression der DNA-Sequenz oder zu einem stark verringerten Umfang erfolgen wird, in der Abwesenheit von z. B. Isopropylthio-beta-D-galactosid. In dieser Situation wird der Mikroorganismus, enthaltend die DNA-Sequenz, vielleicht bis zu einer gewünschten Dichte wachsen gelassen vor der Initiation der Expression des TNF-Inhibitors. Bei dieser Ausführungsform wird die Expression des gewünschten Proteins induziert durch Zusatz einer Substanz zu der mikrobiellen Umgebung, die die Expression der DNA-Sequenz veranlassen kann, nachdem die gewünschte Dichte erreicht worden ist.

(ii) Promotoren

Die Expressionsvektoren müssen Promotoren enthalten, die von dem Wirtsorganismus zur Expression seines eigenen Proteins verwendet werden können. Während das Lactose-Promotorsystem allgemein verwendet wird, sind andere mikrobielle Promotoren isoliert und charakterisiert worden, die dem Fachmann ermöglichen, sie zur Expression von rekombinantem TNF-Inhibitor zu verwenden.

(iii) Transkriptionsterminator

Die hierin vorgesehenen Transkriptionsterminatoren dienen dazu, den Vektor zu stabilisieren. Speziell solche Sequenzen, wie bei Rosenberg, M., und Court, D., in *Ann. Rev. Genet.* **13**: 319–353 (1979) beschrieben, werden ausdrücklich hierin durch Hinweise eingebaut, und werden als in der vorliegenden Erfindung als zu verwenden angesehen.

(iv) Nicht-translatierte Sequenzen

Es wird angemerkt, daß es in der bevorzugten Ausführungsform auch erwünscht sein kann, die 3'- oder 5'-Enden der codierenden Region zu rekonstruieren, um den Einbau von 3'- oder 5'-nicht-translatierten Sequenzen in das Gentranskript zu erlauben. Zu solchen nicht-translatierten Sequenzen zählen solche, die die mRNA stabilisieren, wie sie von Schmeissner, U., McKenney, K., Rosenberg, M., und Court, D., in *J. Mol. Biol.* **176**: 39–53 (1984) identifiziert wurden, und werden hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut.

(v) Ribosomenbindungsstellen

Die mikrobielle Expression von fremden Proteinen benötigt bestimmte Funktionselemente, welche Ribosomenbindungsstellen umfassen, aber nicht darauf beschränkt sind. Eine Ribosomenbindungsstelle ist eine Sequenz, die ein Ribosom erkennt und daran bindet bei der Initiation der Proteinsynthese, wie dargelegt in Gold, L., et al., *Ann. Rev. Microbio.* **35**: 557–580; oder Marquis, D. M., et al., *Gene* **42**: 175–183 (1986), welche beide ausdrücklich hierin durch Hinweis eingebaut werden. Eine bevorzugte Ribosomenbindungsstelle ist GAGGCGCAAAAA(ATG):

(vi) Leader-Sequenz und Translationskuppler

Weiterhin ist es bevorzugt, das DNA, die für eine geeignete Sekretions-Leader (Signal)-Sequenz codiert, am 5'-Ende der DNA-Sequenz vorhanden ist, wie dargelegt von Watson, M. E., in *Nucleic Acids Res.* **12**: 5145:5163, was ausdrücklich hierin durch Hinweis eingebaut wird, wenn das Protein von dem Zytoplasma ausgeschieden werden soll. Die DNA für die Leader-Sequenz

muß sich in einer Position befinden, welche die Herstellung eines Fusionsproteins erlaubt, bei dem die Leader-Sequenz unmittelbar zu und kovalent an den Inhibitor geknüpft ist, d. h. es müssen keine Transkriptions- oder Translations-Terminationssignale zwischen den zwei codierenden DNA-Sequenzen sein. Die Anwesenheit der Leader-Sequenz ist teilweise aus einem oder mehreren der folgenden Gründe erwünscht. Erstens, die Anwesenheit der Leader-Sequenz könnte das Prozessieren des TNF-Inhibitors durch den Wirt erleichtern. Insbesondere könnte die Leader-Sequenz die Spaltung des anfänglichen Translationsprodukts durch eine Leader-Peptidase lenken, um die Leader-Sequenz zu entfernen, und ein Polypeptid mit der Aminosäuresequenz, die potentiell Proteinaktivität besitzt, zurückzulassen. Zweitens, die Anwesenheit der Leader-Sequenz könnte die Reinigung des TNF-Inhibitors erleichtern, indem sie das Protein aus dem Zellplasma leitet. Bei einigen Spezies von Wirtsmikroorganismen wird die Anwesenheit einer geeigneten Leader-Sequenz den Transport des vervollständigten Proteins in den periplasmatischen Raum erlauben, wie das bei einigen der *E. coli* der Fall ist. Im Falle von Ceratin (ceratin) *E. coli*, *Saccharomyces* und Stämmen von *Bacillus* und *Pseudomonas* wird die geeignete Leader-Sequenz den Transport des Proteins durch die Zellmembran in das extrazelluläre Medium erlauben. In dieser Situation kann das Protein aus extrazellulärem Protein gereinigt werden. Drittens, im Falle einiger der Proteine, die durch die vorliegende Erfindung hergestellt werden, könnte die Anwesenheit der Leader-Sequenz notwendig sein, um das vervollständigte Protein in einer Umgebung zu lokalisieren, wo es gefaltet werden kann, um seine aktive Struktur anzunehmen, wobei diese Struktur die geeignete Proteinaktivität besitzt.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist eine zusätzliche DNA-Sequenz unmittelbar vorhergehend der DNA-Sequenz vorhanden, welche für den TNF-Inhibitor codiert. Die zusätzliche DNA-Sequenz kann als ein Translationskuppler funktionieren, d. h. es ist eine DNA-Sequenz, die eine RNA codiert, die dazu dient, Ribosomen unmittelbar benachbart zu der Ribosomenbindungsstelle der Inhibitor-RNA zu positionieren, mit der sie aneinandergrenzt. Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung könnte der Translationskuppler erhalten werden, unter Verwendung der DNA-Sequenz TAACGAGGCGCAAAAATGAAAAAGACAGCTATCGCGATCTTGGAGGATGATTAAATG und Methoden, die gegenwärtig dem Fachmann, der sich mit Translationskupplern beschäftigt, bekannt sind.

(vii) Translationsterminator

Die hierin in Erwägung zu ziehenden Translationsterminatoren dienen dazu, die Translation von mRNA zu stoppen. Sie können entweder natürlich sein, wie beschrieben bei Kohli, J., *Mol. Gen Genet.* **182**: 430–439; oder synthetisiert werden, wie beschrieben bei Pettersson, R. F., *Gene* **24**: 15–27 (1983). Beide der Referenzen werden hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut.

(viii) Selektierbare Marker

Außerdem ist bevorzugt, daß der Klonierungsvektor einen selektierbaren Marker enthält, sowie einen Medikament-Resistenzmarker oder andere Marker, der die Expression einer selektierbaren Eigenschaft durch den Wirtsmikroorganismus verursacht. Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist das Gen für Ampicillinresistenz in dem Vektor enthalten, während in anderen Plasmiden das Gen für Tetracyclinresistenz oder das Gen für Chloramphenicolresistenz enthalten ist. Solch eine Medikamentenresistenz oder andere selektierbare Marker sind teilweise geplant, um die Selektion von Transformanten zu erleichtern. Außerdem könnte die Anwesenheit eines solchen selektierbaren Markers in dem Klonierungsvektor von Nutzen sein, um kontaminierende Mikroorganismen von der Vermehrung in dem Kulturmedium abzuhalten. Bei dieser Ausführungsform würde eine reine Kultur des transformierten Wirtsmikroorganismus erhalten werden, indem der Mikroorganismus unter Bedingungen kultiviert wird, die den induzierten Phänotyp zum Überleben verlangen. Die Funktionselemente, wie hierin erörtert, werden routinemäßig vom Fachmann ausgewählt in Anbetracht früherer Literatur und den hierin enthaltenen Lehren. Allgemeine Beispiele dieser Funktionselemente sind dargelegt, in B. Lewin, *Genes*, Wiley & Sons, New York (1983), was ausdrücklich hierin durch Hinweis eingebaut wird. Verschiedene Beispiele geeigneter Funktionselemente können in den oben erörterten Vektoren gefunden werden und könnten erklärt werden durch erneutes Überprüfen der Veröffentlichungen, die die grundlegenden Eigenschaften der zuvor erwähnten Vektoren erörtern. Durch Synthese und Isolierung aller benötigten und gewünschten Bestandteile des oben erwähnten Vektors, wird der Vektor durch Methoden, die dem Fachmann allgemein bekannt sind, zusammengesetzt. Es wird geglaubt, daß das Zusammensetzen solcher Vektoren zu den Pflichten und Aufgaben gehört, die von einem Fachmann ausgeführt werden, und somit kann dies ausgeführt werden ohne übermäßiges Experimentieren. Zum Beispiel sind ähnliche DNA-Sequenzen in geeignete Klonierungsvektoren legiert worden, wie dargelegt bei Maniatis et al. in *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratories (1984), was hiermit ausdrücklich durch Hinweis eingebaut wird.

Bei der Konstruktion der Klonierungsvektoren der vorliegenden Erfindung sollte außerdem erwähnt werden, daß mehrere Kopien der DNA-Sequenz und ihrer zugehörigen Funktionselemente in jeden Vektor inseriert werden können. Bei einer solchen Ausführungsform würde der Wirtsmikroorganismus größere Mengen des gewünschten TNF-Inhibitors pro Vektor produzieren. Die Anzahl an mehreren Kopien der DNA, die in den Vektor inseriert werden kann, ist nur begrenzt durch die Fähigkeit des resultierenden Vektors, aufgrund seiner Größe, in eine geeignete Wirtszelle transferiert und dort repliziert und transkribiert zu werden.

(b) Andere Mikroorganismen

Vektoren, die für die Verwendung in anderen Mikroorganismen als *E. coli* geeignet sind, werden für diese Erfindung auch in Erwägung gezogen. Solche Vektoren sind in der Tabelle 1 beschrieben. Zusätzlich sind bestimmte bevorzugte Vektoren unten erörtert.

Tabelle 1

Wirt	regulierte Promotoren	Induktor	Transkriptions-Terminator
E. coli	Lac ¹ , Tac ² Iambda pL Trp ⁵	IPTG gesteigerte Temperatur IAA-Zusatz oder Tryptophan-Eerschöpfung	rrnB ⁶ rrnC ⁷
Bacillus	*alpha-Amylase ¹⁷ *Subtilisin ¹⁸ *p-43 ¹⁹ spac-I ²⁶ Trp ²⁷ (E. coli) Lac (E. coli)	IPTG IAA Zusatz oder Tryptophan-Eerschöpfung	E. Coli rrn rrnBT.T ²⁰
Pseudo-monas	Tac (E. coli) Gal 1 ³¹ 10 ³²	IPTG Glucose-Eerschöpfung und Galactose-Glucose-Eerschöpfung	Cyc 1 Una
Hefe	Adh I ³³ II ³⁴ Pho 5	Phosphat-Eerschöpfung Transkriptions-startstelle & Leader-Peptid	Alpha-Faktor Sac 2
E. coli	mRNA Stabilisierung ompA ⁸ Iambda int ⁹ trp ¹⁰	bla ¹¹ ompA ¹² phoS B. amy neutral Protease ²¹ B. amy alpha-Amylase ²² B. subt. Subtilisin ²³	RS Marker Bindungsstelle Ampicillin ¹⁴ Tetracyclin ^{14,15} Chloramphenicol ¹⁶ Kan ^{r24} B. amy neural- Cam ^{r25} Protease B. amy alpha-Amylase ²²
Bacillus		Phospholipase C 28	Sulfonamid ³⁰ Trp (E. coli)
Pseudo-monas		Exotoxin A ²⁸ Invertase ³⁶ saure Phosphatase ³⁶ Alpha-Faktor	Streptomycin ³⁰ Ura 3 ³⁷ Leu 2 ³⁸ His 3 Tap 1
Hefe			

* nicht-reguliert

Literatur

- Backman, K., Ptashne, M., and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **73**, 4174-4178 (1976).
- de Boer, H. A., Comstock, L. J., and Vasser, M., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **80**, 21-25 (1983).
- Shimatake, H., and Rosenberg, M., Nature **292**, 128-132 (1981).
- Derom, C., Gheysen, D., and Fiers, W., Gene **17**, 45-54 (1982).
- Hallewell, R. A., and Emtage, S., Gene **9**, 27-47 (1980).
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D., and Noller, H. F., J. Mol. Biol. **148** 107-127 (1981).
- Normanly, J., Ogden, R. C., Horvath, S. J., and Abelson, J. Nature **321**, 213-219 (1986).
- Belasco, J. G., Nilsson, G., von Gabain, A., and Cohen, S. N., Cell **46**, 245-251 (1986).
- Schmeissner, U., McKenney, K., Rosenberg M., and Court, D. J., Mol. Biol. **176**, 39-53 (1984).
- Mott, J. E., Galloway, J. L., and Platt, T., EMBO J. **4**, 1887-1891 (1985).
- Koshland, D., and Botstein, D., Cell **20**, 749-760 (1980).
- Movva, N. R., Kakamura, K., and Inouye, M. J., Mol. Biol. **143**, 317-328 (1980).
- Surin, B. P., Jans, D. A., Fimmel, A. L., Shaw, D. C., Cox, G. B., and Rosenberg, H. J., Bacteriol. **157**, 772-778 (1984).
- Sutcliffe, J. G., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **75**, 3737-3741 (1978).
- Peden, K. W. C., Gene **22**, 277-280 (1983).
- Alton, N. K., and Vapnek, D., Nature **282**, 864-869 (1979).
- Yang, M., Galizzi, A., and Henner, D., Nuc. Acids Res. **11** (2), 237-248 (1983).
- Wong, S.-L., Price C. W., Goldfarb, D. S., and Doi, R. H., Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1184-1188 (1984).
- Wang, P.-Z., and Doi, R. H., J. Biol. Chem. **251**, 8619-8625, (1984).
- Lin, C.-K., Quinn, L. A., Rodriguez, R. L., J. Cell Biochem. Suppl. **(9B)**, p. 198 (1985).
- Vasantha, N., Thompson, L. D., Rhodes, C., Banner, C., Nagle, J., and Filpula, D., J. Bact. **159**(3), 811-819 (1984).

22. Plava, I., Sarvas, M., Lehtovaara, P., Sibakov, M., and Kaariainen, L., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5582–5586 (1982).
23. Wong, S.-L., Price, C. W., Goldfarb, D. S., and Doi, R. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 1184–1188 (1984).
24. Sullivan, M. A., Yasbin, R. E., Young, F. E., *Gene* **29**, 21–46 (1984).
25. Vasantha, N., Thompson, L. D., Rhodes, C., Banner, C., Nagle, J., and Filula, D. J., *Bact.* **159**(3), 811–819 (1984).
26. Yansura, D. G., and Henner, D. J., *PNAS* **81**, 439–443 (1984).
27. Gray, G. L., McKeown, K. A., Jones, A. J. S., Seeburg, P. H., and Heyneker, H. L., *Biotechnology*, 161–165 (1984).
28. Lory, S., and Tai, P. C., *Gene* **22**, 95–101 (1983).
29. Liu, P. V., *J. Infect. Dis.* **130** (suppl), 594–599 (1974).
30. Wood, D. G., Hollinger, M. F., and Tindol, M. B., *J. Bact.* **145**, 1448–1451 (1981).
31. St. John, T. P., and Davis, R. W., *J. Mol. Biol.* **152**, 285–315 (1981).
32. Hopper, J. E., and Rowe, L. B., *J. Biol. Chem.* **253**, 7566–7569 (1978).
33. Denis, C. L., Ferguson, J., and Young, E. T., *J. Biol. Chem.* **258**, 1165–1171 (1983).
34. Lutsdorf, L., and Megnet, R., *Archs. Biochem. Biophys.* **126**, 933–944 (1968).
35. Meyhack, B., Bajwa, N., Rudolph, H., and Hinnen, A., *EMBO. J.* **6**, 675–680 (1982).
36. Watson, M. E., *Nucleic Acid Research* **12**, 5145–5164 (1984).
37. Gerband, C., and Guérineau, M., *Curr. Genet.* **1**, 219–228 (1980).
38. Hinnen, A., Hicks, J. B., and Fink, G. R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929–1933 (1978).
39. Jabbar, M. A., Sivasubramanian, N., and Nayak, D. P., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**, 2019–2023 (1985).

(i) *Pseudomonas*-Vektoren

Mehrere Vektorplasmide, die in einem weiten Bereich gramnegativer Bakterien autonom replizieren, sind bevorzugt zum Verwenden als Klonierungsvehikel in Wirten der Gattung *Pseudomonas*. Bestimmte von diesen sind beschrieben bei Tait, R. C., Close, T. J., Lundquist, R. C., Hagiya, M., Rodriguez, R. L., und Kado, C. I., in *Biotechnology*, Mai 1983, S. 269–275; Panopoulos, N. J., in *Genetic Engineering in the Plant Sciences*, Praeger Publishers, New York, New York, S. 163–185 (1981); und Sakagucki, K., in *Current Topics in Microbiology and Immunology* **96**: 31–45 (1982), von denen jede hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut wird.

Eine besonders bevorzugte Konstruktion würde das Plasmid RSF1010 und Derivate davon verwenden, wie beschrieben bei Bagdasarian, M., Bagdasarina, M. M., Coleman, S., und Timmis, K. N. in *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*, Timmis, K. N., und Puhler, A., eds., Elsevier/North Holland Biomedical Press (1979), was hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut wird. Die Vorteile von RSF1010 sind, daß es ein relativ kleines, High-Copy-Number-Plasmid ist, das leicht in *E. coli* und *Pseudomonas* Spezies transformiert wird und stabil beibehalten wird. Bei diesem System wäre es bevorzugt, das Tac-Expressionssystem zu verwenden, wie für *Escherichia* beschrieben, da es erscheint, daß der *E. coli* trp Promotor leicht durch *Pseudomonas* RNA Polymerase erkannt wird, wie dargelegt von Sakagucki, K., in *Current Topics in Microbiology and Immunology* **96**: 31–45 (1982) und Gray, G. L., McKeown, K. A., Jones, A. J. S., Seeburg, P. H., und Heyneker, H. L., in *Biotechnology*, Febr. 1984, S. 161–165, welche beide hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut werden. Transkriptionsaktivität kann weiter maximiert werden, was den Austausch des Promotors verlangt, durch z. B. einen *E. coli* der *P. aeruginosa* trp Promotor. Außerdem würde das LacI-Gen von *E. coli* in das Plasmid eingefügt werden, um die Regulation zu beeinflussen.

Die Translation kann an die Translationsinitiation eines jeden *Pseudomonas* Proteins gekoppelt sein, wie auch an Initiationsstellen für jedes der stark exprimierten Proteine der Art, die ausgewählt wurden, um die intrazelluläre Expression des Inhibitors zu bewirken.

In solchen Fällen, wo keine restriktionsnegativen Stämme von einer Wirts-*Pseudomonas*-Spezies zur Verfügung stehen, sind die Transformationseffizienz mit Plasmidkonstrukten, isoliert aus *E. coli*, schlecht. Deshalb ist die Passage des *Pseudomonas* Klonierungsvektors durch einen $r^- m^+$ Stamm einer anderen Spezies vor der Transformation des gewünschten Wirts, wünschenswert, wie dargelegt in Bagdasarian, M., et al., *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*, S. 411–422, Timmis und Puhler eds., Elsevier/North Holland Biomedical Press (1979), was hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut wird.

(ii) *Bacillus*-vektoren

Weiterhin umfaßt ein bevorzugtes Expressionssystem in Wirten der Gattung *Bacillus* die Verwendung des Plasmids pUB110 als das Klonierungsvehikel. Wie bei anderen Wirts-Vektorsystemen ist es in *Bacillus* möglich, den TNF-Inhibitor der vorliegenden Erfindung entweder als intrazelluläres oder als sekretiertes Protein zu exprimieren. Die vorliegenden Ausführungsformen umfassen beide Systeme. Shuttle-Vektoren, die in beiden, *Bacillus* und *E. coli*, replizieren, stehen zur Konstruktion und dem Testen verschiedener Gene zur Verfügung, wie beschrieben bei Dubnau, D., Gryczan, T., Contente, S., und Shivakumar, A. G., in *Genetic Engineering*, Vol. 2, Setlow und Hollander eds., Plenum Press, New York, New York, S. 115–131 (1980), was hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut wird. Für die Expression und Sekretion des TNF-Inhibitors von *B. subtilis* ist die Signalsequenz von Alpha-Amylase vorzugsweise gekoppelt an die codierende Region für das Protein. Zur Synthese intrazellulären Inhibitors wird die bewegliche DNA-Sequenz translational gekoppelt an die Ribosomenbindungsstelle der Alpha-Amylase-Leader-Sequenz. Die Transkription jedes dieser zwei Konstrukte wird vorzugsweise durch den Alpha-Amylase-Promotor oder ein Derivat davon gesteuert. Dieses Derivat enthält die RNA-Polymerase-Erkennungssequenz des nativen Alpha-Amylase-Promotors aber hat die Lac-Operatorregion ebenfalls eingebaut. Ähnliche Hybrid-Promotoren, die aus dem Penicillinase-Gen-Promotor und dem Lac-Operator konstruiert wurden, haben gezeigt, daß sie in *Bacillus*-Wirten in einer regulierbaren Weise arbeiten, wie dargelegt von Yansura, D. G. und Henner in *Genetics and Biotechnology of Bacilli*, Ganesan, A. T., und Hoksch, J. A., eds., Academic Press, S. 249–263 (1984), was hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut wird. Das LacI-Gen von *E. coli* wäre ebenfalls in dem Plasmid enthalten, um die Regulation zu beeinflussen.

(iii) *Clostridium*-Vektoren

Eine bevorzugte Konstruktion zur Expression in *Clostridium* ist im Plasmid pJU 12, beschrieben bei Squires, C. H., et al., in *J. Bacteriol.* **159**: 465–471 (1984) und wird hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut, was in *C. perfringens* transformiert wird nach der Methode von Heefner, D. L., et al., wie beschrieben in *J. Bacteriol.* **159**: 460–464 (1984), was hierin ausdrücklich durch

Hinweis eingebaut wird. Die Transkription wird durch den Promotor des Tetracyclinresistenzgens gesteuert. Die Translation ist an Shine-Dalgarno-Sequenzen dieses *tet*-Gens gekoppelt in einer Art, strikt analog zu den oben ausgeführten Verfahren für Vektoren, die zur Verwendung in anderen Wirten geeignet sind.

(iv) Hefe-Vektoren

Beibehalten von fremder DNA, die in Hefe eingeführt wurde, kann auf mehreren Wegen bewirkt werden, wie beschrieben bei Botstein, D., und Davis, R. W., in *the Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, Cold Spring Harbor Laboratory, Strathern, Jones and Broach, eds., S. 607–636 (1982), was hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut wird. Ein bevorzugtes Expressionssystem zur Verwendung mit Wirtsorganismen der Gattung *Saccharomyces* enthält das TNF-Inhibitorgen auf dem 2-Mikron-Plasmid. Die Vorteile des 2-Mikron-Plasmids umfassen eine relativ hohe Kopienzahl und Stabilität, wenn es in *cir*⁻-Stämme eingeführt wird. Diese Vektoren haben vorzugsweise den Replikationsursprung und mindestens einen Antibiotika-Resistenzmarker von pBR322 eingebaut, um die Replikation und Selektion in *E. coli* zu erlauben. Zusätzlich wird das Plasmid vorzugsweise die 2-Mikro-Sequenz und das Hefe LU 2 Gen haben, um den denselben Zweck in LEU 2-Mangelmутanten von Hefe zu dienen.

Wenn es in Erwägung gezogen wird, daß der rekombinante TNF-Inhibitor letztendlich in Hefe exprimiert werden wird, ist es bevorzugt, daß der Klonierungsvektor zunächst in *Escherichia coli* transferiert wird, wo es dem Vektor erlaubt wäre zu replizieren, und von wo der Vektor nach Amplifikation erhalten und gereinigt werden würde. Der Vektor würde dann in die Hefe transferiert werden zur endgültigen Expression des TNF-Inhibitors.

(c) Säugerzellen

Die cDNA für den TNF-Inhibitor wird als Gen zur Expression des Inhibitors in Säugerzellen dienen. Sie sollte eine Sequenz haben, die effizient Ribosomen bindet, wie diejenigen von Kozak beschrieben in *Nucleic Acids Research* **15**: 8125–8132 (1987), was ausdrücklich hierin durch Hinweis eingebaut wird, und sollte eine Codierungskapazität für eine Leader-Sequenz haben (siehe Abschnitt 3 [a] [vi]), um das reife Protein aus der Zelle in einer prozessierten Form zu leiten. Das DNA-Restriktionsfragment, das die komplette cDNA-Sequenz trägt, kann in einen Expressionsvektor inseriert werden, der einen Transkriptions-Promotor und einen Transkriptions-Enhancer besitzt, wie beschrieben durch Guarente, L., in *Cell* **52**: 303–305 (1988) und Kadonaga, J. T., et al., in *Cell* **51**: 1079–1090 (1987) f, welche beide ausdrücklich durch Hinweis hierin eingebaut werden. Der Promotor kann regulierbar sein wie in dem Plasmid pMSG (Pharmacia Kat. No. 27450601), wenn die konstitutive Expression des Inhibitors für das Zellwachstum schädlich ist. Der Vektor sollte ein vollständiges Polyadenylierungssignal enthalten, wie beschrieben bei Ausubel, F. M., et al. in *Current Protocols in Molecular Biology* Wiley (1987), was hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut wird, so daß die von diesem Vektor transkribierte mRNA richtig prozessiert wird.

Schließlich wird der Vektor den Replikationsursprung und mindestens einen Antibiotika-Resistenzmarker von pBR322 enthalten, um die Replikation und Selektion in *E. coli* zu erlauben.

Um eine stabile Zelllinie zu selektieren, die den TNF-Inhibitor produziert, kann der Expressionsvektor das Gen für einen selektierbaren Marker, wie einen Medikamenten-Resistenzmarker, tragen oder ein komplementäres Gen für eine Mangel-Zelllinie tragen, wie das Dihydrofolatreduktasegen (*dhfr*), um *dhfr*⁻-Zelllinien zu transformieren, wie von Ausubel et al., *supra* beschrieben. Alternativ kann ein getrenntes Plasmid, das einen selektierbaren Marker trägt, mit dem Expressionsvektor cotransformiert werden.

7. Wirtszellen/Transformation

Der so erhaltene Vektor wird in eine geeignete Wirtszelle transferiert. Diese Wirtszellen können Mikroorganismen oder Säugerzellen sein.

(c) Mikroorganismen

Es wird geglaubt, daß jeder Mikroorganismus gewählt werden kann, der die Fähigkeit besitzt, exogene DNA aufzunehmen, und diese Gene und dazugehörige Funktionselemente zu exprimieren. Nachdem ein Wirtsorganismus gewählt worden ist, wird der Vektor in den Wirtsorganismus transferiert unter Verwendung von Methoden, die dem Fachmann allgemein bekannt sind. Beispiele solcher Methoden können gefunden werden in *Advanced Bacterial Genetics* by R. W. Davis et al., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, (1980), was ausdrücklich hierin durch Hinweis eingebaut wird. Es ist bei einer Ausführungsform bevorzugt, daß die Transformation bei niedriger Temperatur erfolgt, da Temperaturregulation in Erwägung gezogen wird als Mittel, die Genexpression zu regulieren durch die Verwendung von Funktionselementen, wie oben dargelegt. Bei einer anderen Ausführungsform, wenn osmolare Regulatoren in den Vektor inseriert worden sind, wäre die Regulation der Salzkonzentration während der Transformation erforderlich, um angemessene Kontrollen der fremden Gene zu gewährleisten. Es ist bevorzugt, daß die Wirtsmikroorganismen fakultativ anaerob oder aerob sind. Besonders bevorzugte Wirte zur Verwendung in dieser Methode umfassen Hefen und Bakterien. Spezielle Hefen umfassen solche der Gattung *Saccharomyces* und ganz besonders *Saccharomyces cerevisiae*. Spezielle Bakterien umfassen solche der Gattungen *Bacillus*, *Escherichia* und *Pseudomonas*, ganz besonders *Bacillus subtilis* und *Escherichia coli*. Weitere Wirtszellen sind in Tabelle 1, *supra* aufgelistet.

(d) Säugerzellen

Der Vektor kann in Säugerzellen in Kultur eingebracht werden durch verschiedene Techniken, wie Kalziumphosphat: DNA-Copräzipitation, Elektroporation oder Protoplastfusion. Die bevorzugte Methode ist Copräzipitation mit Kalziumphosphat, wie beschrieben bei Ausubel et al., *supra*.

Viele stabile Zelltypen existieren, die transformierbar sind und die cDNA transkribieren und translatieren können, den TNF-Inhibitorvorläufer prozessieren und das reife Protein ausscheiden können. Jedoch können die Zelltypen verschieden sein mit Hinsicht auf die Glycosylierung ausgeschiedener Proteine und post-translationale Modifikationen von Aminosäurenresten, wenn überhaupt. Somit sind die idealen Zelltypen solche, die einen rekombinanten TNF-Inhibitor, identisch zu dem natürlichen Molekül, produzieren.

8. Kultivieren gentechnologisch veränderter (engineered) Zellen

Die Wirtszellen werden unter Bedingungen kultiviert, die geeignet sind für die Expression des TNF-Inhibitors. Diese Bedingungen sind üblicherweise spezifisch für die Wirtszelle und können von einem Fachmann leicht ermittelt werden in Anbetracht der veröffentlichten Literatur betreffend Wachstumsbedingungen für solche Zellen und die hierin enthaltenen Lehren. Zum Beispiel enthält Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., Williams & Wilkins Company, Baltimore, Maryland, das hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut wird, Informationen über Bedingungen zum Kultivieren von Bakterien. Ähnliche Informationen zum Kultivieren von Hefe und Säugerzellen können erhalten werden aus Pollack, R., Mammalian Cell Culture, Cold Spring Harborg Laboratories (1975), was hierin ausdrücklich durch Hinweis eingebaut wird.

Jegliche Bedingungen, die zur Regulation der Expression der DNA-Sequenz nötig sind, abhängig von allen in den Vektor inserierten oder vorhandenen Funktionselementen, werden in der Transformations- und Kultivierungsphase wirksam. Bei einer Ausführungsform werden Zellen in Anwesenheit von geeigneten regulierenden Bedingungen bis zu einer hohen Dichte wachsen gelassen, welche die Expression der DNA-Sequenz inhibieren. Wenn eine optimale Zelldichte erreicht ist, werden die Umgebungsbedingungen zu solchen verändert, die zur Expression der DNA-Frequenz geeignet sind. Es ist somit vorauszusehen, daß die Produktion des TNF-Inhibitors in einer Zeitspanne erfolgen wird, anschließend an das Wachstum der Wirtszellen bis zur annähernd optimalen Dichte, und daß der resultierende TNF-Inhibitor einige Zeit, nachdem die regulierenden Bedingungen, die für seine Expression nötig sind, induziert wurden, geerntet wird.

9. Reinigung

(a) TNF-Inhibitor, hergestellt von Mikroorganismen

Bei einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird der rekombinante TNF-Inhibitor gereinigt im Anschluß an seine Ernte und vor der Annahme seiner aktiven Struktur. Diese Ausführungsform ist bevorzugt, da die Erfinder glauben, daß die Wiedergewinnung einer hohen Ausbeute an zurückgefaltetem (re-folded) Protein erleichtert ist, wenn das Protein zuerst gereinigt ist. Jedoch wird bei einer bevorzugten, alternativen Ausführungsform dem TNF-Inhibitor erlaubt, vor der Reinigung rückzufalten, um seine aktive Struktur einzunehmen. In einer weiteren bevorzugten, alternativen Ausführungsform ist der TNF-Inhibitor in seinem rückgefalteten, aktiven Zustand bei seiner Wiedergewinnung aus dem Kulturmedium vorhanden. Bei bestimmten Umständen wird der TNF-Inhibitor seine richtige, aktive Struktur bei der Expression in dem Wirtsmikroorganismus und dem Transport des Proteins durch die Zellwand oder Membran in den periplasmatischen Raum annehmen. Dies wird üblicherweise erfolgen, wenn DNA, die für eine geeignete Leader-Sequenz codiert, an die DNA, die für das rekombinante Protein codiert, geknüpft worden ist. Wenn der TNF-Inhibitor seine richtige, aktive Struktur nicht annimmt, werden zuerst alle die Sulfidbindungen, die gebildet wurden, und/oder jede nicht kovalente Interaktionen, die erfolgt sind, zuerst durch denaturierende und reduzierende Reagenzien zerstört, z.B. Guanidin-Chlorid und Beta-Mercaptoethanol, bevor dem TNF-Inhibitor erlaubt wird, seine aktive Struktur anzunehmen, im Anschluß an das Verdünnen und Oxidieren dieser Reagenzien unter kontrollierten Bedingungen.

Für Reinigungen vor und nach dem Rückfalten werden einige Kombinationen der folgenden Schritte vorzugsweise verwendet; Anionenaustausch-Chromatographie (monoQ oder DEAE-Sepharose), Gelfiltrations-Chromatographie (superose), Chromatofocussierung (MonoP) und hydrophobe Wechselwirkung-Chromatographie (Octyl- oder Phenylsepharose). Von besonderem Wert wird Affinitäts-Chromatographie unter Verwendung von TNF sein (beschrieben in Beispiel 1).

(b) TNF-Inhibitor, hergestellt von Säugerzellen

TNF-Inhibitor, hergestellt von Säugerzellen, wird aus konditioniertem Medium gereinigt durch Schritte, die Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitäts-Chromatographie unter Verwendung von TNF, wie in Beispiel 1 beschrieben, einschließen. Es ist für den Fachmann offensichtlich, daß verschiedene Modifikationen und Variationen bei den Verfahren und Produkten der vorliegenden Erfindung durchgeführt werden können. Somit ist beabsichtigt, daß die vorliegende Erfindung Modifikationen und Variationen dieser Erfindung abdeckt, vorausgesetzt sie fallen unter den Bereichen der angefügten Ansprüche und ihren Äquivalenten.

Wie zuvor angegeben, werden die TNF-Inhibitoren der vorliegenden Erfindung zur Verwendung als therapeutische Reagenzien in Erwägung gezogen und müssen somit in pharmazeutisch akzeptablen Trägerstoffen formuliert werden. Bei einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung können die TNF-Inhibitoren chemisch modifiziert werden, um die pharmakokinetischen Eigenschaften der Moleküle zu verbessern. Ein Beispiel wäre die Anheftung der TNF-Inhibitoren an hochmolekulares Polymermaterial, wie Polyethylenglycol. Zusätzlich können Interleukin-1-Inhibitoren in Verbindung mit den TNF-Inhibitoren verabreicht werden. Diese therapeutische Kombination wird besonders nützlich sein bei der Behandlung von Entzündungs- und degenerativen Krankheiten.

Die folgenden Beispiele erläutern verschiedene, gegenwärtig bevorzugte Ausführungsformen der hierin beanspruchten Erfindung. Alle Unterlagen und Referenzen, die in den folgenden Beispielen zitiert werden, werden ausdrücklich hierin durch Hinweis eingebaut.

Beispiel 1

Protein-Herstellung

A. Materialien

Das Gen für TNF alpha (TNFa) wurde von British Biotechnology, Limited, Oxford, England, bezogen. DEAE-Sepharose CL-6B Harz und Mono-Q HR 5/5, HR 10/10 FPLC Säulen wurden von Pharmacia, Inc. Piscataway, New Jersey, bezogen. Affigel-15 Harz und BioRad Protein-Assay-Kit wurden von Biorad, Richmond, California, bezogen. Tween 20, Ammoniumbicarbonat, Natriumphosphat, PMSF, Natriumbicarbonat, Dithiothreitol, Crystal Violet und Actinomycin D wurden von Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, bezogen. Endoproteinase Lys-C, Endoproteinase Asp-N und TRIS wurden von Boehringer Mannheim, Biochemicals, Indianapolis, Indiana, bezogen. Hexafluoracetone wurde von ICN Biomedicals, Costa Mesa, California, bezogen. Cyanbromid, Trifluoressigsäure und Guanidinhydrochlorid wurden von Pierce Chemicals, Rockford, Illinois, bezogen. Acetonitril und HPLC-Wasser wurden von J. T. Baker Chemical Company, Phillipsburg, New Jersey, bezogen. Harnstoff wurde von Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Maryland, bezogen. (³H)-Jodessigsäure wurde von New England Nuclear, Boston, Massachusetts, bezogen. (¹²⁵I)-TNFa wurde von Amersham Arlington, Heights, Illinois, bezogen.

Rekombinanter menschlicher TNF α wurde von Amgen, Thousand Oaks, California, bezogen. C8-Reversed-Phase-Säulen (7 Mikron, 22 cm $\times$ 2,1 mm) wurden von Applied Biosystems, Foster City, California, bezogen. Corning 96-Loch-Mikrotiterplatten wurden von VWR Scientific, Batavia, Illinois, bezogen. McCoy's 5A-Medien und fötales Rinderserum wurden von Gibco, Grand Island, New York, bezogen. RPMI 1640 Medien und L-Glutamin wurden von Mediatech, Herndon, Virginia, bezogen. Trypsin wurde von K. C. Biologicals, St. Lenexa, Kansas, bezogen. ME 180, U937 und L929 Zelllinien wurden von American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, bezogen.

B. Assays für den TNF-Inhibitor

Zwei Arten von Assays wurden zur Identifizierung des TNF-Inhibitors verwendet. Einer davon ist ein Cytotoxizitäts-Assay. Der andere ist ein Gel-Shift-Assay.

1. Cytotoxizitäts-Assay

Der Cytotoxizitäts-Assay wurde durchgeführt mit Actinomycin D behandelten ME 180-Zellen und L929-Zellen, wie beschrieben von Ostrove and Gifford (Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160, 354–358 [1979]) und Aggarwal and Essalu (J. Biol. Chem. 262, 10000 bis 10007 [1987]). L929-Zellen (CCL1: American Type Culture collection) wurden in McCoy's 5A Medium, enthaltend 10% fötales Rinderserum, gehalten. Konfluente Kulturen wurden kurz mit 0,25% Trypsin in physiologischer Lösung, enthaltend 5 mM EDTA behandelt und in einem frischen Medium resuspendiert. Ungefähr 2×10^4 trypsinisierte Zellen pro Loch wurden in 96-Loch-Platten (Corning) plattiert und für 24 Stunden bei 27°C inkubiert. Dann wurde Actinomycin D zugesetzt bis zu einer Endkonzentration von 0,25 μ g pro ml. Nach 2 Stunden wurden Proben, enthaltend TNF und TNF-Inhibitor, zu den Löchern zugesetzt, und die Inkubation wurde über Nacht bei derselben Temperatur fortgesetzt. Nach mikroskopischer Auswertung wurde das Medium dekantiert, und die Löcher wurden mit PBS gewaschen. Die Löcher wurden dann mit einer Lösung von 0,1% Kristallviolett, 10% Formaldehyd und 10 mM Kaliumphosphat, pH 6,0 für 5 min gefüllt, sorgfältig mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Farbe wurde mit 0,1 M Natriumcitrat in 50% Ethanol pH 4,2 extrahiert. Die Absorption der Farbe in lebenden Zellen wurde bei 570 nm bestimmt unter Verwendung eines kinetischen Mikroplattenlesers (Kinetic microplate reader, Molecular Devices Corp. CA). Ein Beispiel dieses Assays ist in Fig. 1 gezeigt. In der Anwesenheit von TNF-Inhibitor war der cytotoxische Effekt von TNF verringert.

2. Gel-Shift-Assay

Der Gel-Shift-Assay umfaßt die Verwendung eines nativen Polyacrylamidgelelektrophoresesystems. Diese native 4% Gelelektrophorese wurde ausgeführt nach Hendrick and Smith (Arch. Biochem. and Biophysics 126, 155–164 [1968]). Der jodierte TNF (Amersham) wurde mit dem TNF-Inhibitor aus Beispiel 1. C. nach C8-Chromatographie gemischt und für 30 Minuten bis 2 Stunden inkubiert. Diese Mischung wurde gemeinsam mit dem jodierten TNF alleine auf ein 4% natives Gel geladen und elektrophoretisiert. Nachdem das Gel mit 10% Essigsäure fixiert und gewaschen war, wurde ein Film zur Autoradiographie angebracht. Wie in Fig. 2 gezeigt, wandert der Komplex aus TNF und TNF-Inhibitor unterschiedlich zu dem TNF alleine. Dieser Gel-Shift-Assay wurde verwendet, um zu bestimmen, welche Fraktionen des Eluats von der DEAE CL 6B Säulenchromatographie TNF-Inhibitor enthalten.

C. Reinigung des 30 kDa TNF-Inhibitors

Zwanzig Liter Harn eines Patienten, bei dem Nierenfunktionsdiagnostik durchgeführt worden war, wurden mit einer Amicon YM5-Membran auf 200 ml konzentriert. Das Konzentrat wurde bei 4°C gegen 0,025 M Tris-Cl, pH 7,5, dialysiert und anschließend zentrifugiert in einem JA 14 Rotor bei 10000 Upm für 30 Minuten. Der Überstand wurde auf eine 40 $\times$ 4,5 cm DEAE-Sephacel CL-6B Säule geladen, die mit 0,025 M Tris-Cl, pH 7,5 äquilibriert war, und ausgiebig mit Äquilibrierpuffer gewaschen, bis die OD₂₈₀ des Durchlaufs auf die Basislinie zurückging. Die Chromatographie wurde durchgeführt unter Verwendung eines linearen Gradienten von 0 bis 0,05 M Natriumchlorid in 0,025 M Tris-Cl, pH 7,5 und bei OD₂₈₀ registriert. Säulenfraktionen wurden gesammelt und auf TNF-Inhibitoraktivität getestet unter Verwendung des nativen Gel-Assays. Der eluierte TNF-Inhibitor eluiert in einen ziemlich scharfen Peak bei 80 mM NaCl.

Fig. 6A zeigt das OD₂₈₀-Profil der DEAE-Sephacel CL-6B Chromatographie von 20 l Harn. Fig. 6B zeigt die Autoradiographie und den dazugehörigen nativen Gel-Assay, der einen Peak des TNF-Inhibitors bei Fraktionen 57–63 anzeigt, was ungefähr bei 80 mM NaCl ist.

Der TNF-Inhibitor wurde weiter gereinigt unter Verwendung einer TNF-Affinitätssäule. Rekombinanter TNF wurde in PL27/DE3 exprimiert bei ungefähr 10–20% des gesamten Zellproteins. Das Zellpellet wurde mit einer French-Press gepreßt bei ungefähr 20000 psi und das lösliche Material bei 4°C gegen 0,025 M Tris-Cl, pH 8,0, dialysiert. Das dialysierte Lysat wurde 0,2 Mikron gefiltert und auf eine Mono-Q FPLC Säule, äquilibriert mit 0,025 M Tris-Cl, pH 8,0, geladen. Ein linearer Gradient von 0 bis 0,5 M NaCl in 0,025 M Tris-Cl, pH 8,0 wurde angelegt und registriert bei OD₂₈₀. Ein ml-Fraktionen wurden gesammelt und auf Reinheit mit SDS-PAGE analysiert. Der anschließende TNF-Pool war zu ungefähr 90% rein, basierend auf Coomassie-gefärbtem SDS-PAGE und war voll aktiv, basierend auf einem Bradford-Protein-Assay, unter Verwendung von Lysozym als einem Standard, und einem ME 180 Bio-Assay, unter Verwendung von Amgen's TNF α als Standard (Bradford, M., Annal. Biochem. 72, 248–254, [1976]). TNF α wurde in einem Amicon Centriprep-10 auf ungefähr 25 mg/ml konzentriert, dialysiert gegen 100 mM NaHCO₃, pH 8,5 und an Affigel-15 Harz gekuppelt bei 25 mg TNF/ml Harz. Eine Kupplungseffizienz von größer als 80% erzeugte ein Harz hoher Kapazität, das zur weiteren Reinigung des TNF-Inhibitors verwendet wurde.

PMSF, mit einer Endkonzentration von 1–4 mM, wurde dem DEAE CL-6B-Pool zugesetzt und auf eine 4 $\times$ 1 cm TNF-Affinitätssäule gegeben, die bei 4°C mit 0,025 M Tris-Cl, pH 7,5, bei einer Flußrate von 0,1 ml/min äquilibriert war. Die Säule wurde dann mit 0,025 M Tris-Cl, pH 7,5 gewaschen, bis die OD₂₈₀ des Durchlaufs auf die Basislinie zurückging. Die Säule wurde anschließend eluiert mit 0,05 M Natriumphosphat, pH 2,5, und bei OD₂₈₀ registriert. Fig. 7 zeigt das OD₂₈₀-Profil der 0,05 M Natriumphosphat, pH 2,5-Elution von der TNF-Affinitätssäule.

Der TNF-Inhibitor wurde bis zur Homogenität durch Reverse-Phase-HPLC auf einer Syncropak RP-8 (C8)-Säule gereinigt. Der OD₂₈₀-Peak von der TNF-Affinitätssäule wurde gepoolt und sofort auf eine RP-8-Säule geladen, die mit 0,1% TFA/H₂O äquilibriert war, ein linearer 1%/min Gradient von 0,1% TFA/Acetonitril wurde angelegt von 0–50% und bei OD₂₁₅ und OD₂₈₀ registriert.

Fractionen wurden gesammelt und auf Bioaktivität getestet unter Verwendung von L929-Zellen und dem nativen Gel-Assay, wie in Beispiel 1.B. beschrieben. Beide Assays zeigen Bioaktivität bei Fraktionen 28–32 an, was einem Peak von OD₂₁₅ und OD₂₈₀ entspricht, der bei 18% Acetonitril eluiert.

Fig. 8A und 8B zeigen das Chromatographieprofil des TNF-Affinitäts-pools auf einer Synchropak RP-8-Säule mit der dazugehörigen Bioaktivität aus dem L929 Cytotoxizitäts-Assay. Fig. 8B zeigt ein silbergefärbtes 15% reduzierendes SDS-PAGE des RP-8 Pools, welches eine einzelne Bande bei 30 kDa anzeigt.

D. Charakterisierung der Proteinkomponente des 30 kDa TNF-Inhibitors

30 kDa TNF-Inhibitor ist ein Glycoprotein, was festgestellt wurde unter Verwendung von Concanavalin A-Peroxidase, nachdem das Protein auf einen Nitrozellulosefilter transferiert worden war. Diese Methode ist eine Modifikation von Wood und Sarinana (Analytical Biochem. 69, 320–322 [1975]), die Glycoproteine direkt auf einem Acrylamidgel identifizierten. Die Peroxidasefärbung von Glycoprotein wurde ausgeführt unter Verwendung von peroxidasekonjugiertem Con-A oder nicht-konjugiertem Con-A. Wenn nicht-konjugiertes Con-A verwendet wurde, wurde der Nitrozellulosefilter für eine Stunde in eine Lösung, enthaltend Con-A (0,5 mg/ml, Miles Laboratory) in Phosphatpuffer, pH 7,2 (PBS) inkubiert; dann in PBS 3× 5 min gewaschen. Der gewaschene Filter wurde in Meerrettich Peroxidase (0,1 mg/ml, Sigma Chemical) für eine Stunde inkubiert. Nachdem der Filter 3× 15 min in PBS war, wurde der Filter eingelegt in eine Lösung, enthaltend 3 mg/ml 4-Chlor-1-naphthol (Sigma Chemical) und 12,5 µl/ml Wasserstoffperoxid, bis die Farbe entwickelt war. Glycoprotein wurde als purpurne Farbe sichtbar. Sobald der Filter entwickelt war, wurde ein Photo gemacht, wie in Fig. 3 gezeigt.

Chemische Deglycosylierung von TNF-Inhibitor wurde ausgeführt nach der Methode von Edge, Faltynek, Hof, Reichert and Weber (Analytical Biochem. 118, 131–137 [1981]). Eine Mischung von 0,25 ml Anisol (Eastman Kodak) und 0,5 ml von Trifluormethansulfonsäure (Eastman Kodak) wurde auf 4°C abgekühlt und dann wurde 1–200 ng des trockenen TNF-Inhibitors gelöst in 3 µl dieser Mischung. Das Gefäß wurde gefüllt (flushed) mit Stickstoff und dann 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses deglycosylierte Protein wurde auf SDS-PAGE analysiert (Fig. 4). Das Molekulargewicht von chemisch behandeltem TNF-Inhibitor beträgt ungefähr 18 000 Dalton. Eine Bande bei 14 000 wurde auch beobachtet, aber dies kann ein proteolytisches Fragment von deglycoliertem TNF-Inhibitor sein.

Die enzymatische Deglycosylierung unter Verwendung von N-Glycanase wurde dem Protokoll des Herstellers folgend (Genzyme Corp.) durchgeführt, außer daß TNF-Inhibitor mit N-Glycanase für 5–6 Stunden inkubiert wurde anstelle von über Nacht. Das Molekulargewicht der deglycosylierten Form von denaturiertem TNF-Inhibitor ist ungefähr 20 000 Dalton (Fig. 5). Wenn der Inhibitor vor der Deglycosylierung nicht denaturiert ist, beträgt das Molekulargewicht des deglycosylierten Proteins ungefähr 26 000 Dalton.

E. Deglycosylierter 30 kDa TNF-Inhibitor bindet an TNF

Radiomarkierter TNF-Inhibitor (30 kDa) wurde mit TFMSA (Trifluormethansulfonsäure) behandelt, um Kohlenhydratreste zu entfernen, und die TFMSA wurde von dem Protein durch HPLC getrennt. Die Proteinfraction wurde mit TNF-Affigel für eine Stunde bei 4°C gemischt, und das gesamte ungebundene Material wurde durch Zentrifugation entfernt. Das TNF-Affigel wurde ausgiebig mit 50 mM NaPO₄, pH 2,5 gewaschen. Die Radioaktivität in jeder Fraktion wurde gezählt und auch auf SDS-PAGE analysiert. Nichtspezifische Bindung von TNF-Inhibitor wurde gemessen unter Verwendung von Anhydrochymotrypsin-Affigel. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 gezeigt. Diese Ergebnisse zeigen, daß deglycosylierter TNF-Inhibitor (30 kDa) an TNF bindet.

Tabelle 2

Probe	Art der Affinität	gemessene Zerfälle (CPM)	
		Durchlauf	Eluat
Nativer TNF-INH	TNF	49 401 (55,0 %)	40 014 (45,0 %)
Nativer TNF-INH	Anhy CT	80 000 (98,0 %)	1 789 (2,0 %)
TFMSA-behandel-ter TNF-INH	TNF	13 369 (73,0 %)	4 908 (27,0 %)
TFMSA-behandel-ter TNF-INH	Anhy CT	15 682 (94,0 %)	926 (6,0 %)

In einem anderen Experiment wurde radiomarkierter TNF-Inhibitor (30 kDa) reduziert und dann mit N-Glycanase deglycosyliert. Nach der Deglycosylierung wurde das Material mit 13 mM oxidiertem Glutathion (GSSG) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und 5fach verdünnt mit 50 mM Tris. Cystein wurde dann bis zu einer Endkonzentration von 5 mM zugesetzt. Das Material wurde bei 4°C für 16 Stunden inkubiert, dann mit einem TNF-Affigel für eine Stunde bei 4°C gemischt. Nicht gebundenes Material wurde entfernt und das Gel wurde ausgiebig mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 gewaschen. Das gebundene Material wurde eluiert mit 50 mM NaPO₄, pH 2,5. Die Radioaktivität in jeder Fraktion wurde analysiert und ein SDS-PAGE für jede Fraktion wurde durchgeführt. Wie aus Tabelle 3 und Fig. 18 ersichtlich, bindet auch der deglycosylierte und reoxidierte TNF-Inhibitor an TNF.

Tabelle 3

Probe	Art der Affinität	gemessene Zerfälle (CPM)	
		Durchlauf	Eluat
Nativer TNF-INH	TNF	18 281 (60,0 %)	12 603 (40,0 %)
Nativer TNF-INH (reduziert/ reoxidiert)	TNF	28 589 (94,0 %)	1 964 (6,0 %)
TFMSA-behandelt (reduziert/ reoxidiert)	Anhy CT	31 371 (98,7 %)	421 (1,3 %)
Deglycosylier- ter TNF-INH (reduziert/ reoxidiert)	TNF	25 066 (85,0 %)	4 305 (15,0 %)
Deglycosylier- ter TNF-INH (reduziert/ reoxidiert)	Anhy CT	29 619 (98,4 %)	495 (1,6 %)

Beispiel 2**Sequenzieren des 30 kDa TNF-Inhibitors**

N-terminale Sequenzen wurden bestimmt unter Verwendung des Applied Biosystems Protein Sequencers, Modell 470 und 477. Vor dem Sequenzieren wurden Peptide, die durch eine Vielzahl von proteolytischen Enzymen gebildet wurden, gereinigt auf einer Applied Biosystems C8-Microbore HPLC Säule (22 cm × 2,1 mM).

A. Sequenzieren des Aminoterminus

Ungefähr 250 pmole von reverse-phase (RP-8)-gereinigtem TNF-Inhibitor wurde direkt auf einen Polybren-Filter gegeben und automatisiertem Edman-Abbau unterworfen. Die resultierende Sequenzinformation ergab die ersten 30 Aminosäuren des Moleküls.

B. Endoproteinase Lys-C Verdau von nativem Protein

Ungefähr 250 pmole (5 µg) von reverse-phase-gereinigtem TNF-Inhibitor wurde mit 1 µg Endoproteinase Lys-C verdaut. Die 12 Stunden Verdau bei 25°C wurden in der Anwesenheit von 1 M Harnstoff, 0,01 % Tween 20 und 150 mM NH₂HCO₃, pH 8,0, durchgeführt. Vor der Peptidreinigung wurde der Verdau reduziert durch Inkubation für eine Stunde im Anschluß an die Zugabe eines 50fachen molaren Überschusses von Dithiothreitol, oder reduziert und alkyliert durch eine weitere Stunde Inkubation bei 37°C unter Verwendung eines 2fachen molaren Überschusses an (³H)-Jodessigsäure über Dithiothreitol. Fig. 9A zeigt das Reverse-Phase-HPLC-Muster dieses Verdaus. Fig. 9B zeigt das Reverse-Phase-HPLC-Muster dieses Verdaus im Anschluß an die Alkylierung.

C. Endoproteinase Asp-N Verdau von nativem Protein

Ungefähr 250 pmol (5 µg) von reverse-phase-gereinigtem TNF-Inhibitor wurde mit 0,5 bis 2,5 µg Endoproteinase Asp-N verdaut. Der 12–18stündige Verdau bei 37°C wurde durchgeführt in der Anwesenheit von 1 M Guanidin-HCl, 0,01 % Tween 20 und 150 mM NaPhos, pH 8,0.

Vor der Peptidreinigung wurde der Verdau reduziert und alkyliert, wie in Beispiel 2.B. Fig. 10 zeigt das Reverse-Phase-HPLC-Muster von zwei solchen Verdaus.

D. Reduktion Carboxymethylierung von Protein

Der Reverse-Phase-HPLC gereinigte TNF-Inhibitor wurde reduziert und carboxymethyliert mit (³H)-Jodessigsäure wie beschrieben bei Glazer et al., in Chemical Modifications of Proteins, S. 103–104 (1975), außer daß zwei aufeinanderfolgende Runden der Reduktion gefolgt von Alkylierung verwendet wurden. Das Protein wurde wieder gereinigt durch Reverse-Phase-HPLC vor dem proteolytischen Verdau.

E. Endoproteinase V8 Verdau von reduziertem carboxymethyliertem Protein

Ein analytischer Verdau wurde durchgeführt, indem 55 pmol (ungefähr 1 µg) von reduziertem carboxymethyliertem TNF-Inhibitor in 150 mM NaHCO₃, pH 8,0 gelöst wurden und durch Verdauen mit 0,2 µg V8-Protease für 18 Stunden bei 25°C. Reverse-Phase-HPLC (Fig. 11 A) brachte drei sequenzierbare Peptide zutage und zeigte, daß ein Verdau in größerem Maßstab in Ordnung war. Ungefähr 220 pmol (4,5 µg) von reduziertem carboxymethyliertem TNF-Inhibitor wurde mit 1 µg V8-Protease für 5 Stunden bei 25°C verdaut, als weitere 0,5 µg einer V8-Protease zugesetzt wurden, und der Verdau für 16 Stunden fortgesetzt wurde. Fig. 11 B zeigt die Reverse-Phase-HPLC des V8-Verdaus im großen Maßstab.

F. Komplette Primärstruktur von 30 kDa TNF-Inhibitor, basierend auf Peptidsequenzen und cDNA-Sequenzen

Verschiedene Peptidfragmente wurden gegeneinander ausgerichtet (aligned), entsprechend der in Beispiel 4 erhaltenen cDNA-Sequenz. Dies wird in Fig. 19 gezeigt. Reste, die durch Protein-Sequenzierung nicht identifiziert wurden, sind Reste Nummern 14, 42, 43, 44, 96, 97, 105, 107, 108 und 110 bis 119. Die Sequenz von Gln-Ile-Glu-Asn ist anscheinend der Carboxylterminus des 30 kDa TNF-Inhibitors.

Beispiel 3**30kDa TNF-Inhibitor wird von U937-Zellen hergestellt, die mit PMA und PHA stimuliert sind.**

Die monocyten-ähnliche Zelllinie U937 wuchs bei 37°C in RPMI-Medium, enthaltend 10% fötales Kälberserum, bis zu einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml. Die Zellen wurden durch Zentrifugation entfernt und auf fünf verschiedenen 100 cm² Petriplatten resuspendiert bei 2×10^6 Zellen/ml in RPMI ohne Serum, enthaltend 10 ng/ml PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) und 5 µg/ml PHA-P (Phytohemagglutinin-P). Das konditionierte Medium von einer Platte wurde nach nur 10 Minuten der Inkubation geerntet und als Nullzeitkontrolle verwendet. Das Medium der restlichen Platten wurde nacheinander bei 24 Stunden, 48 Stunden, 72 Stunden und 76 Stunden nach Plattieren entfernt. Das in diesen Proben enthaltene Protein wurde je auf ungefähr 400 µl konzentriert durch eine Centriprep-10 (Amicon Corp.)-Behandlung. Jede 400-µl-Probe wurde dann gemischt mit einem gleichen Volumen an einer Affigel-15 (Biorad Corp.) Präparation, enthaltend ungefähr 10 mg/ml von gereinigtem menschlichen rekombinantem TNFa, das in unserem Labor hergestellt worden war. Von diesem TNFa war vor dem Binden an das Affigel-15-Harz gezeigt worden, daß es bioaktiv ist, durch eine Toxizität auf Mäuse L929-Zellen.

Das konditionierte Medium wurde batch-weise mit TNFa-Affinitäts Harz für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die ungebundene Fraktion wurde nach Zentrifugation des Harzes entfernt, und das Harz wurde anschließend mit 1 ml (500 µl, 2x) von PBS phosphatgepufferte Kochsalzlösung, pH 7,5, enthaltend 0,1% Gelatine, gewaschen. Gebundenes Material wurde eluiert mit einer 25 mM Lösung von monobasischem Natriumphosphat, pH 2,5 (400 µl, 2x). 40 µl einer jeden der ungebundenen, gewaschenen und eluierten Fraktionen wurden getrocknet, resuspendiert in 10 µl 25 mM Tris, pH 7,5, gemischt mit 2 µl (100 pci) von ¹²⁵I-TNFa (400–800 ci/mmol, Amersham) und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Mischungen wurden gemischt mit 5 µl 40% Saccharose und 1 ml 0,1% Bromphenolblau und auf ein 4% natives Acrylamidgel gegeben, wie in Beispiel 1. B. beschrieben. Das konditionierte Medium von allen Proben, außer der Nullkontrolle, enthielt nach diesem Assay TNFa-Bindungsaktivität, wie in Fig. 15 gezeigt.

Die restlichen 300 ml von jeder Probe (1. Elution bei niedrigem pH) wurden auf eine C8 HPLC-Säule gegeben und eluiert mit einem linearen Gradienten von Acetonitril für 60 Minuten (1%/min, 1 ml/min Flußrate, 1 ml Fraktionen wurden gesammelt). Jede Fraktion wurde getrocknet und resuspendiert in 50 µl PBS + 0,1% Gelatine. 10 µl von jeder dieser Proben wurde mit ¹²⁵I-TNFa wie oben gemischt und analysiert durch ein natives Polyacrylamidgel. TNFa-Bindungsaktivitäten werden in Fraktionen festgestellt entsprechend 33% und 36% Acetonitril, wie in Fig. 16 gezeigt.

Beispiel 4**Analyse von Messenger-RNA von PMA/PHA-behandelten U937-Zellen**

U937-Zellen wuchsen, wie in Beispiel 3 beschrieben, zu einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml und wurden dann resuspendiert in serumfreiem Medium bei 2×10^6 Zellen/ml ohne oder mit PMA (10 ng/ml) und PHA (5 µg/ml). Proben wurden genommen bei einer Stunde +/– PMA/PHA und 17 Stunden nur + PMA/PHA. Gesamte RNA wurde von diesen Zellen hergestellt nach der Guanidin-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode von Chomczynski and Sacchi (Analytical Biochemistry 162:156–159 [1987]). PolyA⁺-RNA wurde von Gesamt-RNA hergestellt durch Hybridisieren an Oligo dT-Zellulose (Bethesda Research Labs). 8 Mikrogramm einer jeden PolyA⁺-RNA wurden auf ein 6,6% Formaldehyd, 1,2% Agarosegel gegeben. Die RNA in dem Gel wurde dann auf eine Zeta-Probe-Membran (BioRad) geplottet. Die Membran wurde behandelt, wie im Beispiel 5 für das Absuchen von menschlichen genomischen DNA-Banken mit Oligonucleotidproben beschrieben. 1×10^6 cpm/ml einer markierten einzelsträngigen DNA-Probe (Polynucleotidkinase) wurde zugesetzt. Die Sequenz dieser Probe ist:

5' TTGTGGCACTTGGTACAGCAAAT 3'

und entspricht den Basen 410–433 der Sequenz, wie in Fig. 13 dargelegt. Folgend auf die Hybridisierung bei 65°C über Nacht wurde die Membran einmal bei Raumtemperatur in 6x SSC 0,1% SDS und einmal bei 65°C in derselben Lösung gewaschen und dann exponiert mit einem Röntgenfilm für 72 Stunden. Das in Fig. 17 gezeigte Autoradiogramm zeigt, daß MPA:PHA-Behandlung von U937-Zellen in serumfreiem Medium für 1 Stunde die Expression der 30 kDa TNFa-Inhibitor Messenger-RNA deutlich stimuliert und daß nach 17 Stunden der Behandlung diese RNA praktisch in den Zellen nicht mehr vorhanden ist. Das Molekulargewicht der 30 kDa TNFa-Inhibitor Messenger-RNA, basierend auf diesem Experiment, beträgt ungefähr 2,4 Kilobasen.

Beispiel 5**Herstellung einer menschlichen genomischen DNA-Bank für den 30kDa TNF-Inhibitor**

Menschliche genomische DNA wurde partiell verdaut mit Sau3AI und größe selektiert. DNA mit einer mittleren Größe von 15 KB wurde in die BAMHI Stelle des Bacteriophagen Lambda Charon 30 ligiert (Rimm, D. L., Horness, D., Kucera, J., und Blattner, F. R. Gene 12:301–309 [1980]). Phagen wurden vermehrt und amplifiziert auf E. coli CES 200.

A. Proben

Die vier degenerierten Oligonucleotidhybridisierungsproben, die in Tabelle 4 aufgelistet sind, wurden auf einem Applied Biosystems DNA-Synthesizer synthetisiert. Jede Probenmischung bestand aus allen möglichen DNA-Sequenzen, die für die gegebene Peptid-Sequenz codierten.

Tabelle 4

Peptid Name	Peptid Sequenz	Probe Name	Probe Sequenz
LysC 18	KEMQVE	TNFBP-P20	5'TCNACTCTGNCCATTCTCTCTT 3'
LysC 11	QGKYIHP	TNFBP-P2'	5'CAAGGGNAAAGTATCACATCC 3'
LysC 11	YNDCPG	TNFBP-P3'	5'TATCAATCGATCTGTCCNNGG 3'
LysC 11	YIHPQNN	TNFBP-P4	5'TTAGTTTCTGNGGAGTCAGT 3'

N = G, A, T, oder C

Oligonucleotide wurden markiert mit (γ - ^{32}P) ATP (Amersham Inc., Arlington Heights, IL) und T4 Polynucleotidkinase (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) bis zu einer spezifischen Aktivität von $6-9 \times 10^6$ cpm/picomol nach Anleitung des Herstellers.

B. Methoden

$8,4 \times 10^5$ Lambda Phagen, enthaltend menschliche genomische DNA, wurden plattiert und auf duplikate Nitrozellulosefilter transferiert. Diese Filter wurden mit 1 pMol/ml der Probe TNFBP-P2' für 16 Stunden hybridisiert in einer Lösung, enthaltend 1,0 M NaCl, 0,1 M Natriumcitrat, $2 \times$ Denhardtslösung (Denhardt, D. T. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23: 641–646 [1966]), 0,1 % SDS, 0,05 % Natriumpyrophosphat und 150 $\mu\text{g/ml}$ Hefe tRNA, bei einer Temperatur von 52°C. Diese Temperatur ist 2°C unterhalb der berechneten T_m für den AT-reichsten Bestandteil des Oligonucleotidpools (Suggs, S. V. in *Developmental Biology Using Purified Genes*, [Brown, D. D., and Fox, C. F., eds.] Academic Press, New York, S. 683–693 [1981]). Nach dem Hybridisieren wurden die Filter für 45 Minuten bei Umgebungstemperatur dreimal gewaschen mit 1 M NaCl, 0,1 M Natriumcitrat und 0,5 % SDS. Ein stringentes Waschen für acht Minuten wurde bei der berechneten T_m (d. h. 2°C oberhalb der Hybridisierungstemperatur) für das AT-reichste Mitglied des Pools durchgeführt. Die Filter wurden dann getrocknet und autoradiographiert für 40 Stunden mit einem Verstärkungsschirm bei –70°C.

Elf positive hybridisierende Plaques wurden festgestellt, und diese wurden isoliert und amplifiziert. Die Fähigkeit dieser Klone, mit TNFBP-P20, TNFBP-P3' und TNFBP-P4 zu hybridisieren, wurde getestet unter Verwendung ähnlicher Methoden. Ein Klon (TNFBP-8) hybridisierte mit allen vier Oligonucleotiden. Dieser Klon wurde plaque-gereinigt und amplifiziert. DNA wurde von diesem Klon hergestellt unter Verwendung von Lambda-Sorb (Promega Corporation, Madison, WI) und einer vom Hersteller beschriebenen Methode.

Ein Mikrogramm dieser DNA wurde verdaut mit *Sau3A*I, und die Fragmente wurden subkloniert in *BAM*HI verdautem M13-Sequenziervektor mp18 (Yanish-Perron, C., Viera, J., and Messing, J. *Gene* 33: 103–119 [1985]). M13-Klone wurden dann auf duplikate Nitrozellulosefilter transferiert und mit den Oligonucleotidproben aus Tabelle 4 hybridisiert unter Verwendung von zuvor beschriebenen Bedingungen. Positive Subklone wurden gereinigt und sequenziert (Sanger, F., and Coulson, A. R. *J. Mol. Biol.* 94: 441–448 [1975]) unter Verwendung einer modifizierten T4 DNA-Polymerase (Sequenase, US-Biochemical Corp., Cleveland OH), wie vom Hersteller beschrieben, und unter Verwendung eines Primers, entweder den degenerierten Proben, die zur Identifizierung der Klone verwendet wurden, oder Sequenzen, die unter Verwendung dieser Proben erhalten wurden. Unter den erhaltenen Sequenzen sind diejenigen der Subklone TNFBP-M13-*Sau3A*-P2'-2 und TNFBP-M13-*Sau3A*-P4 Primer P3, P3', P2', P2 und P4. Die Sequenz enthält DNA, die für mindestens 48 Aminosäuren des 30 kDa TNF-Inhibitor Peptids codiert, die anders sind als diejenigen, die durch die Proben spezifiziert sind, und bestätigt deshalb, daß der Klon TNFBP8 für TNF-Inhibitor codiert. Die Sequenz zeigt auch, daß das Gen für TNF-Inhibitor mindestens ein Intron einschließt (GTAGGGGCAA ... CCCCATTCACAG). Schließlich zeigt diese Sequenz, daß der 30 kDa TNF-Inhibitor als Vorläuferprotein synthetisiert wird, und daß eine proteolytische Spaltung an der Arg-Asp-Sequenz notwendig ist, um das reife, aktive Protein zu bilden.

Beispiel 6

Herstellung und Absuchen einer cDNA-Bank aus mRNA mit PMA/PHA-stimulierten U937-Zellen

Das in Beispiel 4 beschriebene Experiment zeigt, daß mit PMA/PHA für eine Stunde behandelte U937-Zellen einen Pool an Messenger-RNA enthalten sollten, der mit dem TNF-Inhibitor (30 kDa) angereichert ist. Demzufolge wurde eine cDNA-Bank aus PolyA⁺-RNA hergestellt, die aus mit PMA/PHA behandelten U937-Zellen erhalten wurde, wie in Beispiel 4 beschrieben.

Doppelsträngige DNA mit glatten Enden wurde aus annähernd 5 μg Poly A⁺-RNA erhalten, im wesentlichen wie beschrieben bei Gubler, U., and Hoffman, B. J., *Gene*, 25: 263 (1983) unter Verwendung postengetesteter Reagenzien (Amersham, Arlington Heights, IL) nach dem von Hersteller empfohlenen Verfahren. Ungefähr 1 μg erhaltener doppelsträngiger cDNA wurde behandelt mit dem Enzym *Eco*RI-Methylase, und *Eco*RI-Linker mit der Sequenz: d(pCCGGAATTCGG) (New England Biolabs, Beverly, MA) wurden mittels T4 DNA Ligase im Anschluß an den Verdau mit Endonuclease *Eco*RI angehängt. Dieses DNA wurde dann in einem Lambda-Bakteriophagen Klonierungsvektor gt10 ligiert (Young, R. A., and Davis, R. W. [1983] *Proc Natl. Acad Sci USA*, 80: 1194–1198), der mit *Eco*RI verdaut worden war, und das Produkt wurde in infektiöse Lambda-Bakteriophagen-Partikel verpackt unter Verwendung eines Lambda-DNA-Verpackungs-Extrakts (Gigapack II Gold), der von Stratagene (La Jolla, CA) erhalten wurde, nach deren Protokoll. Dieses Lambda-Lysat (cDNA-Bank) wurde dann verwendet, um *E. coli* Stamm C600 hflA zu infizieren, und es wurde gezeigt, daß die Bank annähernd $2,5 \times 10^6$ rekombinierte Mitglieder enthielt.

Annähernd 4×10^5 Mitglieder dieser Bank wurden auf *E. coli* Stamm C600 hflA (5×10^4 p. f. u./Platte) plattiert. Duplikate Abzüge auf Nitrozellulose wurden hergestellt, und die Filter wurden behandelt, wie es in Beispiel 5 zum Absuchen der menschlichen genomischen Bank beschrieben ist. Die DNA auf den Filtern wurde dann mit derselben ^{32}P -markierten Probe hybridisiert, wie in Beispiel 4 beschrieben, außer daß die Inkubationstemperatur 42°C betrug. Von 4×10^5 plattierten rekombinanten Phagen hybridisierten drei Plaquesduplikate mit dieser Probe. Diese wurden weiter isoliert und wie oben mit Proben analysiert und mit einer zusätzlichen synthetischen Probe mit der Sequenz: 5' CCCCGGGCCTGGACAGTCATTGTA 3' hybridisiert.

Diese Probe entspricht den Basen 671–694 des menschlichen genomischen TNF-Inhibitorklons, der in Fig. 13 gezeigt ist. Beide Proben hybridisierten mit allen drei Plaques, die mit der ersten Probe identifiziert wurden.

Nach der Plaquereinigung wurde von diesen drei Klonen DNA hergestellt und in die *Eco*RI-Stelle des M13-Vektors mp18 und mp19 subkloniert, wie in Beispiel 5 beschrieben. Jede dieser cDNAs besteht aus zwei *Eco*RI-Fragmenten, eines von ungefähr 800 bp, das allen drei Klonen gemeinsam ist, und ein anderes von 1300 bp, 1100 bp oder 1000 bp, abhängig von dem jeweiligen Klon. Der wahrscheinliche Ursprung des einzigartigen *Eco*RI-Fragments in jedem Klon ist unvollständige Verlängerung durch das Enzym-Reverse Transkriptase während der Erststrang-Synthese der cDNA. Deshalb stellen diese *Eco*RI-Fragmente wahrscheinlich die 5'-Enden der TNF-Inhibitor mRNA dar und das 800-bp-Fragment das 3'-Ende. Dies wird durch die von diesen Fragmenten erhaltenen DNA-Sequenz bestätigt, wie unten beschrieben.

Von den *Eco*RI-Subklonen der obenbeschriebenen cDNA wurde die gesamte Sequenz der 2100 bp cDNA erhalten. Die Dideoxynucleotidkettenabbruchmethode zum Sequenzieren wurde verwendet (Sanger, F. and Coulson, A. R. [1975] *J. Mol. Biol.* 94: 441–448). Die modifizierte T7 DNA-Polymerase, Sequenase (U. S. Biochemical, Cleveland, OH) wurde als Verlängerungsenzym verwendet, wie vom Lieferanten beschrieben. Sequenzierprimer waren synthetische Oligonucleotide, die

von der menschlichen genomischen Sequenz des TNF-Inhibitors, wie in Fig. 13 gezeigt, hergestellt wurden, oder Sequenzen, die unter Verwendung dieser Primer erhalten wurden. Fig. 20 zeigt die von einem der cDNA-Klone erhaltene translatierte Sequenz. Diese Sequenz entspricht derjenigen, die aus den Proteinsequenzdaten, wie in Fig. 19 beschrieben, erhalten wurden. Die gesamte Sequenz der menschlichen 30 kDa TNF-Inhibitor cDNA von Klon Lambda-gt10-7ctnfbp ist in Fig. 21 gezeigt.

Beispiel 7

Expression der 30 kDa TNF-Inhibitor cDNA in *Escherichia coli*

Der Anteil des TNF-Inhibitor (30 kDa) cDNA-Gens, der für die lösliche TNFa-Bindungsaktivität codiert, ist zur Expression in *E. coli* hergestellt worden wie unten beschrieben.

Da der proteincodierenden Sequenz, die den C-terminalen Anteil des aus Harn stammenden TNF-Inhibitors codiert (Sequenz OIEN, Base 771, Fig. 20), kein Terminationscodon in der cDNA-Sequenz folgt, wurde eins zugefügt durch Oligonucleotid gelenkte *in vitro* Mutagenese (Biorad, Richmond, CA). Ein M13mp19-Klon des 1300 bp EcoRI-Fragments aus dem Klon Lambda-gt107ctnfbp wurde hybridisiert mit dem synthetischen Oligonucleotid:

5' CTACCCAGATTGAGAATTAAGCTTAAGGGCACTGAGGAC 3'

Nach der zweiten Strangsynthese und Transfektion in einen geeigneten Wirt wurden Mutantenklone durch Hybridisierung mit dem obenbeschriebenen mutagenisierten Oligonucleotid identifiziert. Die molekulare Identität der so identifizierten Klone wurde durch DNA-Sequenzierung wie beschrieben (Beispiel 5) bestätigt. Als nächstes wurde ein 468-bp-Fragment, definiert durch Styl (Position 303) und Hind III, das den C-Terminus des Proteins definiert, entfernt von der Rf-Form als ein mutagenisierter Klon und in das *E. coli*-Expressionsplasmid enthaltend den *tacl* Promotor (DeBoer, H.A., et al. [1983] *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 21–25) inseriert. Diese Konstruktion wurde vervollständigt unter Verwendung der synthetischen doppelsträngigen Adaptersequenz:

5' GATCCGATCTTGGAGGATGATTAAATGGACAGCGTTTGCCCC 3'
GCTAGAACCTCCTACTAATTTACCTGTCGCAACGGGGGTTTC

Dieser Adapter kuppelt translationale das TNF-Inhibitorgen (verkürzte Form, wie oben beschrieben) an die ersten 12 Codons des Bakteriophagen T7 Gens 10. Die DNA-Sequenz dieses Konstrukts von dem Punkt der Translationsinitiation bei Gen 10 einschließlich der Adaptersequenz ist in Fig. 22 gezeigt. Ein Methionincodon (ATG) ist notwendigerweise an die TNF-Inhibitorgensequenz zur Expression in *E. coli* angefügt. Dieses Plasmid wird pTNFiX-1 genannt. Das vorhergesagte Molekulargewicht dieses Proteins ist ungefähr 17 600 Da, das sehr nahe dem des deglycosylierten nativen TNF-Inhibitors (30 kDa) ist.

Beispiel 8

Reinigung von aktivem TNF-Inhibitor (30 kDa) von *Escherichia coli*

Zellen von 1 l *E. coli* Kultur (pTNFiX-1JM1071on-), die für 2 Stunden unter induzierenden Bedingungen wuchsen, wurden resuspendiert in 10 ml von 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, enthaltend 2 mM EDTA (TE-Puffer), und wurden mit einer Frenchpress behandelt bei 20 000 psi bei 4°C. Das Material wurde bei 20 000 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde einmal mit TE-Puffer gewaschen. Das gewaschene Pellet wurde in 2 ml 6 M Guanidin-HCl Nach der Inkubation wurden 80 µl von 500 mM DTT zugesetzt, und die Mischung wurde bei Raumtemperatur für weitere 30 Minuten inkubiert. Das Material, das nach dieser Behandlung unlöslich blieb, wurde durch Zentrifugation bei 20 000 g für 15 Minuten entfernt. 120 µl 500 mM oxidiertes Glutathion wurde dem Überstand zugesetzt, und die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Das Material wurde dann in 20 ml 0,6% Tribasenlösung verdünnt und 220 µl 500 mM Cystein wurde zugesetzt. Die Inkubation wurde für weitere 16 Stunden bei 4°C fortgesetzt. Nach 16 Stunden Inkubation wurde etwas unlöslicher Rest beobachtet. Dieses unlösliche Material wurde durch Zentrifugation bei 20 000 g für 20 Minuten entfernt. Der resultierende Überstand wurde gegen 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 für 16 Stunden bei 4°C dialysiert, dann bei 20 000 g für 10 Minuten zentrifugiert. PMSF mit einer Endkonzentration von 4 mM wurde diesem Überstand zugesetzt, und dieses Material wurde auf eine TNF-Affinitätsäule (7 x 2 cm) bei einer Flußrate von 0,1 ml pro Minute geladen. Diese Säule wurde ausgiebig mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, gewaschen, und gebundene Proteine wurden mit 50 mM NaPO₄-HCl, pH 2,5, eluiert. Das pH 2,5-Eluat wurde auf eine RP8-Säule geladen, die zuvor mit 0,1% TFA/H₂O äquilibriert worden war. TNF-Inhibitor wurde mit einem linearen Gradienten von 0,1% TNF/Acetonitril bei 1%/min eluiert (Fig. 25). Fraktionen wurden auf SDS-PAGE (Fig. 26) analysiert, und ein Cytotoxizitäts-Assay wurde durchgeführt (Fig. 25), um den TNF-Inhibitor zu lokalisieren. Der *E. coli*-hergestellte TNF-Inhibitor (30 kDa) wandert bei ungefähr 20 kDa, da er nicht glycosyliert ist. Fraktionen Nummer 30 bis 35 enthalten TNF-Inhibitor. Die aminoterminalen Sequenz dieses Materials zeigt, daß der von *E. coli* produzierte TNF-Inhibitor die folgende Sequenz besitzt:

Met-Asp-Ser-Val(-)-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-Asn-Asn-Ser-

Unter Verwendung dieses Verfahrens wurden ungefähr 40 µg TNF-Inhibitor (30 Da) aus einem Liter Kulturmedium erhalten. Die Ausbeute betrug ungefähr 2 bis 3%. Die Ausbeute kann auf über 50% gesteigert werden, indem der TNF-Inhibitor vor dem Rückfalten gereinigt wird.

Beispiel 9

Expression von Genen, die den 30 kDa TNF-Inhibitor codieren, in tierischen Zellen.

Die Expression von TNF-Inhibitor in tierischen Zellen verlangt die folgenden Schritte:

- Konstruktion eines Expressionsvektors
- Wahl einer Wirts-Zelllinie
- Einführen des Expressionsvektors in Wirtszellen
- Manipulation rekombinanter Wirtszellen, um die exprimierten Spiegel an TNF-BP zu steigern.

1. TNF-Inhibitor-Expressionsvektoren, die zur Verwendung in tierischen Zellen entworfen wurden, können verschiedener Art sein, umfassend stark konstitutive Expressionskonstrukte, induzierbare Genkonstrukte, wie auch solche, die zur Expression in speziellen Zelltypen entworfen wurden. In allen Fällen werden Promotoren und andere genregulierende Regionen, wie Enhancer (induzierbar oder nicht) und Polyadenylierungssignale, an der geeigneten Stelle in bezug auf die cDNA-Sequenzen in den auf Plasmiden basierenden Vektoren angebracht. Zwei Beispiele solcher Konstrukte folgen.

Ein Konstrukt, das eine stark konstruktive Promotorregion verwendet, kann unter Verwendung der Kontrollsignale der sehr frühen Gene (immediate early genes) des Cytomegalovirus (CMV) hergestellt werden. Dieses Plasmid kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken (Maniatis, et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, 1982) konstruiert werden, und zu dem in Fig. 23 gezeigten Plasmid führen (pCMVXV beta TNFBPstopA). Der Replikationsursprung von SV 40 ist in diesem Plasmid enthalten, um seine Verwendung in COS-Zellen für transiente Expressions-Assays zu erleichtern. Dieses spezielle Konstrukt enthält den CMV-Immediate-Early-Promotor und Enhancer, wie beschrieben bei Boshart, et al., (*Cell* 41: 521–530, 1985), gefolgt von dem zweiten Intron des B-Globins (siehe van Oyen et al., *Science* 206: 337–344, 1979), das vom BamHI und EcoRI Restriktionsspaltstellen flankiert wird. Dieses Intron ist enthalten, da gezeigt worden ist, daß die Expressionsspiegel gesteigert werden, wenn Introns in den transkribierten Regionen einiger Expressionsvektoren enthalten sind (Buchman and Berg, *Mol. Cell. Biol.* 8: 4395–4405, 1988). Das Polyadenylierungssignal wird von der Simian Virus 40 (SV 40) Sequenz zur Verfügung gestellt (Kartenkoordinaten 2589–2452; siehe Reddy et al., *Science* 200: 494–502, 1978). Die 30kDa TNF-Inhibitor cDNA-Sequenzen sind wie folgt modifiziert worden: die ausgedehnte Region, die 3' des C-Terminus des aus menschlichem Harn gereinigten TNF-Inhibitors lokalisiert ist, ist deletiert worden, und ein Stopcodon ist in die Position unmittelbar folgend auf das C-terminale Asparagin eingebaut worden. Die nichtmodifizierten 30kDa TNF-Inhibitor cDNA-Sequenzen in einem analogen Vektor sind in COS-Zellen eingeführt worden und haben gezeigt, daß sie die TNF-Bindungsaktivität solcher Zellen steigern.

Das zweite Konstrukt (siehe Fig. 24) (pSVXVTNFBP stop A) verwendet die stark konstitutive Promotorregion von SV 40 frühem Gen (early gene) in einer Anordnung, wie sie in dem Plasmid pSV2CAT (Gorman, et al., *Mol. Cell. Biol.* 2: 1044–1051, 1982) gefunden wurde. Dieses Plasmid sollte auf solche Weise manipuliert werden, daß die TNF-Inhibitor-cDNA die codierenden Sequenzen für Chloramphenicol Acetyltransferase ersetzt unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken. Wieder einmal wurde die TNF-Inhibitor cDNA modifiziert, wie oben für das CMV-Promotorkonstrukt beschrieben. Die SV 40 frühe Promotor Region (early promoter) umfaßt Sequenzen von der HindIII Stelle bis zur BamHI Stelle (Kartenkoordinaten 5090–188; siehe Reddy et al., *Science* 200: 494–502, 1978) und das SV 40 Polyadenylierungssignal wie oben für das CMV-Konstrukt beschrieben.

2. Zwei tierische Zelllinien sind verwendet worden, um unter Verwendung der obenbeschriebenen Vektoren TNF-Inhibitor zu exprimieren, um aktives Protein herzustellen. Zelllinien, die für ihre Fähigkeit, die Expression dieser fremden Gene zu fördern, charakterisiert worden sind, umfassen Affennierenzellen, COS-7 und Dihydrofolatreduktasemangelzellen (dhfr-) der Ovarien des chinesischen Hamsters (CHO).

3. Um eine von CHO abstammende permanente Zelllinie zu etablieren, die 30kDa TNF-Inhibitor in das Zellkulturmedium ausscheidet, ist ein TNF-Inhibitor-Expressionsplasmid in diesen dhfr-Zellen zusammen mit einem Plasmid, das die Synthese von Dihydrofolatreduktase steuert, eingebracht worden unter Verwendung der Kalzium-Phosphat-DNA-Präzipitationstechnik, wie beschrieben von Graham und van der Eb (*Virology* 52: 456–467, 1973). Die Zellen, die DNA aufgenommen haben und DHFR exprimieren, wurden selektioniert, wie durch Ringold et al., (*J. Mol. Appl. Genet.* 1: 165–175, 1981) beschrieben.

4. Zellen, die das TNF-Inhibitor-Genkonstrukt exprimieren, können manipuliert werden, um die Spiegel der Produktion an TNF-Inhibitor zu steigern. Zellen, die TNF-Inhibitor-Expressionsvektoren zusammen mit einem DHFR-Expressionsvektor enthalten, sollten das Protokoll zur Genamplifikation durchlaufen, wie beschrieben von Ringold et al. (*J. Mol. Appl. Genet.* 1: 165–175, 1981), unter Verwendung von Methotrexat als kompetitiver Antagonist von DHFR. Genamplifikation führt zu mehr Kopien der DHFR- und TNF-Inhibitor-Gene, die in den Zellen vorhanden sind, und begleitend zu gesteigerten Spiegeln an TNF-Inhibitor mRNA, die ihrerseits zu mehr von den Zellen produziertem TNF-Inhibitor-Protein führt.

Beispiel 10

Isolierung von zwei Arten von TNF-Inhibitoren aus U937-konditioniertem Medium und Existenz des zweiten TNF-Inhibitors in menschlichem Harn

Die menschlichen U937-Zellen wuchsen bis zur Dichte von 1×10^5 Zellen pro ml in 150-cm²-Flaschen unter Verwendung von RPMI1640-Medium, enthaltend 200 Einheiten/ml Penicillin, 200 Einheiten/ml Streptomycin, 10% fötales Kälberserum. Nach drei Tagen der Inkubation bei 37°C wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 1500 g für 7 Minuten geerntet. Die Zellen wurden bei einer Dichte von 2×10^6 /ml RPMI1640 Medium ohne Serum resuspendiert. Die Zellen wuchsen in der Anwesenheit von 5 µg/ml PHA-P (Phytohemagglutinin) und 10 ng/ml PMA (Phobol-12-myristat-13-acetat) für 24 Stunden.

Das 24-Stunden-Medium (4425 ml) wurde durch Zentrifugation gesammelt und durch Amicon YM5-Filter auf ungefähr 100 ml konzentriert. Dieses Material wurde durch ein TNF-Affinitätsgel (0,7 × 2 cm) laufengelassen bei einer Flußrate von 0,1 ml/min, und das Gel wurde ausgiebig mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 50 mM NaPO₄-HCl, pH 2,5 eluiert, und der TNF-Inhibitor wurde von anderen kontaminierenden Proteinen durch HPLC-RPC8 abgetrennt. Wie aus Fig. 27 ersichtlich, wurden zwei TNF-Inhibitorpeaks beobachtet. SDS-PAGE-Analyse der RPC8-Fractionen zeigt, daß die Molekulargewichte der zwei Peaks grob 30kDa und 40kDa Proteinen entsprechen (Fig. 28). Das 30kDa Protein (TNF-INH1) wurde amino-terminaler Sequenzanalyse unterzogen, und es wurde gefunden, daß es die gleiche Sequenz hat wie der obenbeschriebene 30kDa TNF-Inhibitor aus Harn. Jedoch zeigt die Proteinsequenz des 40kDa Proteins, daß es nicht das gleiche ist wie das 30kDa Protein (siehe Beispiel 11). Weitere Reinigung des zweiten TNF-Inhibitorpeaks in dem menschlichen Harn, der um Fraktion 35 in Fig. 8 zu sehen ist, zeigt, daß es auch das 40kDa TNF-Inhibitorprotein ist (Fig. 29 und 30).

Der 40 kDa TNF-Inhibitor ist auch ein Glycoprotein. Dies wurde festgestellt unter Verwendung von Concanavalin A-Peroxidase, nachdem das Protein auf einen Nitrozellulosefilter transferiert worden war, wie in Beispiel 1.D. beschrieben. Es wurde gezeigt, daß das Molekulargewicht des N-Glycanase behandelten 40 kDa TNF-Inhibitors auf SDS-PAGE ungefähr 36 kDa beträgt (siehe Verfahren wie in Beispiel 1.D. beschrieben).

Folgend den Verfahren, wie oben in Beispiel 1.E. beschrieben, könnte ermittelt werden, daß der deglycosylierte 40 kDa TNF-Inhibitor auch an TNF alpha bindet. Zusätzlich könnte auch vielleicht gezeigt werden, daß das deglycosylierte 40 kDa Protein an TNF beta (Lymphotoxin) bindet.

Beispiel 11

Proteinsequenzierung von U937-stammenden 30 kDa TNF-Inhibitor, 40 kDa TNF-Inhibitor und 40 kDa TNF-Inhibitor aus Harn
Aminoterminal Sequenzen der Proteine wurden ermittelt unter Verwendung eines Applied Biosystem Protein Sequencer, Model 470. Beide, native und reduzierte, carboxymethylierte Proteine, wurden sequenziert. Ungefähr 300 pmole von reverse-phase (RP-8)-gereinigten TNF-Inhibitoren wurden auf einen Polybrenfilter gegeben und automatisiertem Edman-Abbau unterworfen. Die resultierende Sequenz ist in Fig. 31 gezeigt. Es ist ersichtlich, daß das von U 937 stammende 30 kDa Protein das gleiche ist wie dasjenige, das in Harn gebildet und identifiziert wurde. Das 40 kDa TNF-Inhibitorprotein ist nicht das gleiche wie das 30 kDa TNF-Inhibitorprotein. Das 40 kDa TNF-Inhibitorprotein aus Harn enthält keine zwei aminoterminalen Reste. Ansonsten ist es das gleiche wie das aus U 937 stammende 40 kDa Protein.

Beispiel 12

Primärstruktur des 40 kDa TNF-Inhibitors

Ungefähr 40 µg des reduzierten und carboxymethylierten TNF-Inhibitors (40 kDa) wurde verdaut mit Endoprotease V8, wie oben beschrieben, und die resultierenden Peptide wurden auf einer RPC 18-Säule getrennt. (Fig. 33). Die gereinigten Peptide wurden sequenziert unter Verwendung eines Applied Biosystem Protein Sequencers, Model 47. Ungefähr 90 µg des reduzierten und carboxymethylierten TNF-Inhibitors wurde mit 5 µg Endopeptidase Arg-C in 0,2 M Ammoniumbicarbonat bei 37°C behandelt. Nach 24 Stunden Verdau wurde das Arg-C-verdaute Material auf eine HPLC-RP 8-Säule geladen, um die Peptide zu trennen (Fig. 32). Gereinigte Peptide wurden wie zuvor sequenziert. Einige der Peptide wurden weiter verdaut mit PTCK-Trypsin oder Chymotrypsin. Ungefähr 500 pmole von arg-C16-Peptid wurden mit 3 µg TPCK-Trypsin (Boehringer Mannheim) in 0,2 M Ammoniumbicarbonat bei 37°C für 7 Stunden behandelt, und die Peptide wurden unter Verwendung von RP8 getrennt (Fig. 34). Ungefähr 200 pmole des Peptids arg-C 10 wurde mit 1 µg Chymotrypsin (Boehringer Mannheim) bei 37°C für dreieinhalb Stunden verdaut, und die resultierenden Peptide wurden auf einer PRC 18 getrennt (Fig. 35). Eine partielle Struktur des TNF-Inhibitors (40 kDa) wurde bestimmt durch Aufeinanderausrichten verschiedener überlappender Peptide (Fig. 36). Eine komplette Primärstruktur des 40 kDa TNF-Inhibitors ist in Fig. 38 gezeigt. Auf nicht durch Proteinsequenzierung identifizierte Reste wurde geschlossen durch erneutes Überprüfen der Sequenz des cDNA-Klons, der den 40 kDa TNF-Inhibitor codiert und der in Beispiel 14A diskutiert und in Fig. 39 beschrieben wird.

Beispiel 13

Identifizierung von cDNA-Klonen für den 40 kDa TNFa-Inhibitor

Die in Beispiel 9 dargestellte Information zeigt, daß mit PMA und PHA behandelte U 937-Zellen einen TNFa-Inhibitor produzieren mit einem Molekulargewicht von ungefähr 40 kDa. Dieses Protein ist gereinigt worden, und anschließend ist seine Aminosäuresequenz bestimmt worden, wie in Beispiel 12 beschrieben. Tabelle 5 zeigt die Sequenzen mehrerer Peptide, die von diesem Protein stammen, und gibt die Sequenzen gemischter Sequenzen von Oligonucleotidproben an, die zum Isolieren von für den hierin beschriebenen 40 kDa TNF-Inhibitor codierenden Genen verwendet wurden.

Das Gen, das für Sequenzen codiert, die den 40 kDa Inhibitor umfassen, kann aus menschlichen genomischen Banken, wie in Beispiel 5 beschrieben, isoliert werden, oder aus einer cDNA-Bank, die aus von U 937-Zellen, die mit PMA und PHA für ungefähr 9 Stunden behandelt worden waren (siehe Beispiel 14), erhalten wurden, konstruiert ist. Jede Bank sollte ungefähr $1,0 \times 10^6$ Rekombinanten enthalten.

Tabelle 5

Peptid-Sequenz	Probenname	Probensequenz
EYYDQTA	40KD-P2'	C 5' GAATATTATGATCAAACAGC 3' G C C C G G T
AQUAFT	40KD-P1	C C C 5' GTAAAACGAACCTTGAGC 3' G G G C G T T T
KQEGCR	40KD-PG	C 5' AAACAAGAAGGATGTCT 3' G G G G CAC T
QMCCSKC	40KD-P5	C 5' CATTTAGAACAACACATTTG C GCTG G C T C
DQTAQMC	40KD-P6'	C C 5' GATCAAACAGCACAAATGTG 3' C G G G G T T
PGWYCA	40KD-P7	C C C C 5' CCAGGATGGTATTGTGC 3' G G T T

Beispiel 14**Isolierung von 40 kDa TNF-Inhibitor cDNA-Sequenzen von PMA/PHA-induzierten U937-Zellen**

U937 mRNA wurde aus Zellen isoliert, die durch PMA/PHA für 9 Stunden induziert worden waren. Sie wurde dann auf einer Oligo-dT-Säule selektioniert, und die so isolierte polyadenylierte mRNA wurde verwendet, um dscDNA herzustellen, unter Verwendung von reverser Transkriptase, gefolgt von E. coli-Polymerase I/RNase H. Die dscDNA wurde einer Polymerasekettenreaktion unterworfen unter Verwendung der in Tabelle 5 gezeigten degenerierten Proben (40KD-P1' und 40KD-P7) als Primer. Ein die DNA-Produkte dieser Reaktion enthaltender Southern Blot wurde mit der Probe 40KD-P6' (siehe Tabelle 5) hybridisiert, wobei eine einzige Bande, die diese Sequenz enthielt, identifiziert wurde. Diese Bande wurde aus einem Agarosegel isoliert und in M13 Phagen DNA (Stamm mp18) kloniert. Nach der Transformation in E. coli Stamm JM109 und Ausplattieren auf einem Medium, enthaltend X-Gal und IPTG, wurden deutliche Plaques identifiziert, die das korrekte cDNA-Insert enthielten. Die Sequenz der DNA in diesem Klon ist in Fig. 37 zusammen mit dem von dieser Sequenz vorhergesagten Translationsprodukt gezeigt. Diese Aminosäuresequenz paßt zu der in Fig. 36 (Reste 12–104) und Fig. 38 gezeigten Sequenz.

Beispiel 14A**Isolierung eines 40 kDa TNF-Inhibitor cDNA-Klons von PMA/PHA-induzierten U937-Zellen**

mRNA wurde isoliert (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry 18, 5294–5299) aus menschlichen U937-Zellen, die PHA und PMA für 9 Stunden ausgesetzt waren. mRNA wurde von dieser RNA gereinigt unter Verwendung von Oligo-dT-Zellulose (Aviv, H. and Leder, P., 172, Proc. Natl. Acad. Sci. [USA] 69, 1408–1412). 5 µg dieser mRNA wurden verwendet, um 3 µg doppelsträngiger cDNA mit glatten Enden zu synthetisieren (Gubler, U., and Hoffman, B. J., 1983, Gene 25, 263–269). Nach Zusatz von EcoRI-Linker wurde die cDNA gereinigt durch Säulenchromatographie mittels Zentrifugieren durch Sephacryl S-400 (Pharmacia) und Ethanol präzipitiert. 100 ng dieser cDNA wurde in 1 µg EcoRI-verdautes und alkalischer Phosphatase behandeltem Lambda gt-10 ligiert und verpackt in vitro unter Verwendung von Gigapack gold (Stratagene). Die verpackte cDNA ergab $2,5 \times 10^6$ Rekombinanten beim Plattieren auf E. coli C600 hfl. $1,2 \times 10^6$ Mitglieder dieser Bank wurden in Duplikaten abgesucht mit 32 P-markierter Probe 40KD-P6 + 7 (5' GGG CGT ATG TGC TGT CCT CAC AGG 3') wie beschrieben (Benton, W. D., and Davis, R. W., 1977, Science 196, 180–182). Zwölf positive hybridisierende Klone wurden isoliert und erneut abgesucht mit Proben 40KD-P6' und 40KD-P7 (siehe Tabelle E im Beispiel AC5K-ier dieser 8klone hybridisierten mit allen drei Proben 2iner dieser 8kloneL cDJ18#6, wurde verdaut mit EcoRI, und ein 2,2kb-Insert wurde isoliert und subkloniert in beiden Orientierungen in dem Bakteriophagen M13-Vektor mp19 (Yarrish-Perron, C., et al., 1985, Gene 33, 103–119). Die Sequenz wurde von beiden Strängen bestimmt unter Verwendung der Kettenabbruchmethode (Sanger, F. and Coulson, A. R., 1975, J. Mol. Biol. 94, 441–448) mit Taq DNA-Polymerase (US-Biochemical). Diese Sequenz ist in Fig. 39 zusammen mit seinem daraus geschlossenen Translationsprodukt gezeigt. Die Sequenz enthält einen einzigen offenen Laseraster, der sich von dem ATG-Triplet bei Base 93, das sich deutlich hinter der C-terminalen Sequenz des 40 kDa Proteins bei dem GAC-Triplet bei Base 863 befindet, erstreckt.

Beispiel 15

Der 40kDa TNF-Inhibitor inhibiert TNF beta wie auch TNF alpha

Beide, der 30kDa TNF-Inhibitor und der 40kDa TNF-Inhibitor wurden untersucht, um zu bestimmen, ob sie auch die Aktivität von TNF beta (Lymphotoxin) hemmen können. Verschiedene Konzentrationen von TNF beta (bezogen von Endogen) wurden mit jedem der Inhibitoren für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die resultierenden Mischungen wurden mittels des L929-Zellassaysystems, wie in Beispiel 1.B.1. für TNF alpha beschrieben, analysiert. Diese Experimente ergaben, daß der 30kDa TNF-Inhibitor einen geringen inhibitorischen Effekt auf TNF beta besitzt. Jedoch zeigte der 40kDa TNF-Inhibitor eine deutliche TNF beta Inhibition. Die Ergebnisse dieser Experimente können aus Fig.40 entnommen werden.

Beispiel 16

Herstellung einer menschlichen genomischen DNA-Bank für den 40kDa Inhibitor

Eine geeignete menschliche genomische DNA-Bank für den 40kDa TNF-Inhibitor kann hergestellt werden, wie in Beispiel 5 für den 30kDa TNF-Inhibitor beschrieben.

Beispiel 17

Herstellung von Genen für die Expression der 40kDa TNF-Inhibitor cDNA in Escherichia coli

Teile des TNF-Inhibitors (40kDa) cDNA-Gens, das für die löslichen TNF-Bindungsaktivitäten (Fig.39) codiert, sind für die Expression in E.coli hergestellt worden, wie unten beschrieben.

Da es schwierig gewesen ist, die C-terminale Sequenz des aus Harn oder U-937 stammenden reifen 40kDa TNF-Inhibitors definitiv zu bestimmen, konstruierten wir drei Derivate seiner cDNA-codierenden Sequenz, basierend auf Sequenzanalysen der cDNA-Klone. Das erste reicht bis zur vermuteten Transmembransequenz dieses Proteins, Basenpaar 863 (Fig. 39) und endet mit der Peptidsequenz (... Gly Ser Thr Gly Asp). Die nächsten beiden sind 51 ($\Delta 51$) und 53 ($\Delta 53$) Aminosäuren kürzer als dieser Klon und enden beim Basenpaar 710 ... Ser Pro Thr bzw. Basenpar 704 ... Ser Thr Ser.

Jede dieser drei C-Termini wurde hergestellt durch In-vitro-Mutagenese („Mutagene“, BioRad, Richmond, CA) von M 13-Klonen der cDNA des 40kDa TNF-Inhibitors. Der längste Klon wurde zuerst hergestellt unter Verwendung der folgenden synthetischen Oligonucleotide:

1. 5' CAC TGG CGA CTA AGC TTC GCT CTT C 3'
2. 5' GCG GCG CAC GCC GGA TCC GAT CTT GGA GGA TGA TTA
AAT GTT GCC CGC CCA G 3'

Oligonucleotid 1 fügt ein Translationsterminationscodon nach Aminosäure 235, Asp, ein und erzeugt eine HindIII Restriktionsendonuclease-Erkennungsstelle an diesem Punkt. Oligonucleotid 2 paßt die endterminale Sequenz des reifen Proteins an, Leu Pro Ala ... bp 159 (Fig. 39) zur Expression in E. coli durch 1) Einfügen eines Met, ATG-Condons bei Aminosäure Position 1, und 2) Einfügen einer Translationskuppplersequenz und einer 5' BamHI Restriktionsendonuclease-Erkennungsstelle. Das mutagenisierte Fragment wurde durch BamHI/HindIII-Verdau von der Rf DNA des mutierten M 13-Klons entfernt und eingebaut in ein E. coli-Expressionsplasmid, wie in Beispiel 7 beschrieben. Dieses Genkonstrukt tragende Klone werden TNF.40 genannt.

Die zwei verkürzten Klone wurden wie oben konstruiert unter Verwendung der mutagenisierten M 13-Derivate des oben isolierten 40kDa TNF-Inhibitorklons und den folgenden Oligonucleotiden:

- 5' GTCCCCACCTAAGCTTCGGAGTATGG 3' $\Delta 51$
5' GTCCACGTCCTAAGCTTCCACCCGGA 3' $\Delta 53$

Diese zwei Oligonucleotide führen Translations-Terminations-Kodons bei bp 710 bzw. 704 ein (Fig.39). Diese Genkonstrukte tragen Klone werden TNF:40 $\Delta 51$ bzw. TNF:40 $\Delta 53$ genannt.

Beispiel 18

Expression von 40kDa TNF-Inhibitor codierenden Genen in tierischen Zellen

Die Expression des 40kDa TNF-Inhibitorklons in tierischen Zellen kann, wie in Beispiel 9 beschrieben, durchgeführt werden. Die ausgedehnte Region, die 3' des C-Terminus des 40kDa TNF-Inhibitors gelegen ist, kann deletiert werden, und ein Stopkodon kann in die Position unmittelbar folgend der C-terminalen Asparaginsäure eingebaut werden.

Beispiel 19

Expression der kompletten cDNA-Sequenz, die den 30kDa TNF-Inhibitor codiert, in Säugerzellen steigert die TNF-Rezeptorstellen.

Es wurde ein Expressionsvektor hergestellt, der die gesamte 30kDa TNF-Inhibitor cDNA (2,1 kb), wie in Fig. 21 gezeigt, enthielt, genannt p30KXVA, und war in jeder anderen Hinsicht identisch zu dem in Fig. 23 gezeigten Vektor (d. h., die in dieser Figur gezeigten TNF-BP-Sequenzen wurden ersetzt durch die 2,1 kb cDNA unter Verwendung der einzigen EcoRI-Stelle in dem Plasmid). Siehe Beispiel 9 für eine vollständige Beschreibung dieses Expressionsvektors. Dieses Plasmid wurde in Cos7-Zellen unter Verwendung der Lipofektinmethode eingeführt, wie beschrieben durch Feigner et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 [1987]). Transfizierte Zellen wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, (125 I) TNF zu binden. Fig. 41 zeigt die Ergebnisse des Bindungstests dieser Zellen, die scheintransfiziert oder mit dem Expressionsvektor p30KXVA transfiziert waren. Die Zahl der Bindungsstellen auf plasmid-transfizierten Zellen ist drastisch höher als die Zahl auf den Kontrollzellen. Der komplette cDNA-Klon (d. h. das offene Leseraster, das ein viel größeres Protein codiert als der aus Harn stammende 30kDa Inhibitor) stellt tatsächlich einen cDNA-Klon eines TNF-Rezeptors dar.

Beispiel 20

Expression von cDNA, die den 40kDa TNF-Inhibitor codiert, in Säugerzellen steigert die TNF-Rezeptorstellen

Es wurde ein Expressionsvektor hergestellt unter Verwendung des 2,4kb cDNA-Fragments, isoliert aus den in Beispiel 14A beschriebenen Lambda-Phagen page # 6. Dieses Plasmid war identisch zu dem in Beispiel 9 beschriebenen (Fig. 23), außer daß die 40kDa TNF-Inhibitor-cDNA-Sequenz die 30kDa TNF-Inhibitor-cDNA-Sequenz in diesem Plasmid ersetzte. Es wurden Plasmide isoliert mit dem 2,4kb EcoRI cDNA-Fragment in beiden Orientierungen, genannt p40KXVA (Sinnorientierung) und p40KXVB (Anti-Sinnorientierung). Diese Plasmide enthalten den Replikationsursprung von SV40, den Cytomegalovirus Immediate Early Promotor und Enhancer, das zweite Intron des Hasen B-Globins, die 40kDa TNF-Inhibitor cDNA und das SV40 frühe Polyadenylierungssignal in einem auf pBR322 basierenden Plasmid (für eine vollständige Beschreibung dieses Vektors, siehe Beispiel 9). Diese Plasmide wurden in COS7-Zellen transfektiert, die dann auf TNF-Bindung getestet wurden (siehe Fig. 42). Zellen, die mit p40KXVA transfektiert waren, zeigten eine höhere Anzahl an TNF-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche als entweder COS7-Zellen alleine oder COS7-Zellen transfektiert mit p40KXVB, was nahelegt, daß diese cDNA einen TNF-Rezeptor codiert. Andere solcher Zellen, wie CHO-Zellen, konnten entwickelt werden, die diesen Rezeptor überproduzieren konnten oder die den 40kDa TNF-Inhibitor in das Gewebekulturmedium ausscheiden, wie in Beispiel 9 beschrieben.

Beispiel 21

Inhibitor, isoliert aus menschlichen Monozyten

Menschliche Monozyten wurden aus 550ml Blut hergestellt (wie beschrieben durch Hannum, C.H. et al., Nature 343, 336–340, 1990). Die frischen Monozyten (2×10^7 Zellen) wurden in 500 ml serumfreies RPMI1640-Medium gegeben und mit 10 ng/ml PMA und 5 µg/ml PHA-P für 24, 48 und 72 Stunden bei 37°C behandelt. Nach der Inkubation wurden die Medien durch Zentrifugation gesammelt und auf 50 ml konzentriert. Die konzentrierten Medien wurden auf eine TNF-Affinitätsäule (2 ml Bettvolumen) als eine Probe bei einer Zeit geladen und wie in Beispiel 1 mit Säure eluiert. Das eluierte Material wurde weiter gereinigt unter Verwendung einer HPLC RPC-8-Säule unter denselben Bedingungen wie in Beispiel 1, und jede Fraktion wurde mit dem L929-Cytotoxizitätsassay getestet. Fig. 43 zeigt die zwei Peaks der TNF-inhibierenden Aktivität. Diese zwei Peaks entsprechen den 30kDa und 40kDa TNF-Inhibitoren, die auch in dem Kulturmedium von U937-Zellen, die mit PMA und PHA behandelt wurden, gefunden wurden und in Harn identifiziert wurden.

Beispiel 22

Expression und Reinigung von kürzeren Formen des 40kDa TNF-Inhibitors ($\Delta 51$ und $\Delta 53$) von E. coli

Zellen von 300 ml E. coli-Kulturen (40kDa TNF-Inhibitor $\Delta 51$ und 40kDa TNF-Inhibitor $\Delta 53$), die getrennt unter induzierten Bedingungen für zwei Stunden wuchsen, wurden in 10 ml von 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, enthaltend 2 mM EDTA (TE-Puffer), resuspendiert und mit einer French Press behandelt bei 20000 g für 10 Minuten. Die resultierenden Pellets wurden einmal mit TE-Puffer gewaschen. Die gewaschenen Pellets wurden in 2 ml 6M Guanidin-HCl/100 mM Tris-HCl, pH 8,5/4 mM PMSF resuspendiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 500 mM DTT zugesetzt bis zu einer Endkonzentration von 4 mM, und die Mischung wurde für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Unlösliches Material wurde durch Zentrifugation bei 20000 g für 15 Minuten entfernt. 500 mM oxidiertes Glutathion wurde dem Überstand bis zu einer Endkonzentration von 20 mM zugesetzt, und die Mischung wurde bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Dieses Material wurde in 20 ml 0,6% Tris-Basenlösung mit 5 mM Cystein verdünnt. PMSF wurde bis zu einer Endkonzentration von 2 mM zugesetzt. Nach 16 Stunden Inkubation bei 4°C wurde dieses Material gegen 300 Volumen 50 mM Tris-HCl, pH 7,5 für 3 Stunden bei 4°C dialysiert, dann zentrifugiert bei 20000 g dialysiert, dann zentrifugiert bei 20000 g für 15 Minuten. Der Überstand wurde auf eine TNF-Affinitätsäule (0,7 x 2 cm, 13 mg rhTNF/ml Affigel-10) bei einer Flußrate von 0,09 ml/min geladen. Diese Säule wurde ausgiebig mit 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, gewaschen. Die gebundenen Proteine wurden mit 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{HCl}$, pH 2,5, eluiert. Die sauren Eluate wurden auf eine RP8-Säule (2 x 200 mm, Spelco) geladen, und die TNF-Inhibitoren wurden mit einem linearen Gradienten von Acetonitril in 0,1% TFA bei einer Flußrate von 1 ml pro Gradient pro Minute eluiert (Fig. 44A und 45A).

Fraktionen wurden mit dem L929-Cytotoxizitätsassay untersucht, um die TNF-Inhibitoren zu lokalisieren. Der Hauptpeak in jedem RP8-Profil enthält die TNF-inhibierende Aktivität (Fig. 44b und 45B). Die von E. coli hergestellten TNF-Inhibitoren (40kDa TNF-Inhibitor $\Delta 53$ und 40kDa TNF-Inhibitor $\Delta 51$) wandern zu der erwarteten Position auf SDS-PAGE (Fig. 44B und 45B). Die aminoternale Sequenz dieser Materialien zeigt, daß die von E. coli hergestellten TNF-Inhibitoren die folgende Sequenz besitzen:

Met-Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu

Unter Verwendung dieses Verfahrens wurden ungefähr 150 µg eines jeden 40kDa TNF-Inhibitors ($\Delta 51$ und $\Delta 53$) aus 30 ml der Kultur erhalten. Die Ausbeute betrug ein paar Prozent, jedoch kann die Ausbeute auf über 30% gesteigert werden, indem jeder Reinigungsschritt verbessert wird.

Beide dieser 40kDa TNF-Inhibitoren ($\Delta 51$ und $\Delta 53$) inhibieren nicht nur TNF alpha, sondern auch TNF beta.

Beispiel 23

Expression und Reinigung von vollständigem 40kDa TNF-Inhibitor

Ein aktiver 40kDa TNF-Inhibitor wurde aus einem E. coli-Stamm gereinigt, der Plasmide enthielt, die ein Gen für den vollständigen, reifen 40kDa TNF-Inhibitor (wie in Beispiel 12) enthalten. Die Methode, die zum Isolieren eines aktiven Inhibitors verwendet wurde, war dieselbe wie in Beispiel 22. Dieser aktive Inhibitor inhibiert beide, TNF alpha und TNF beta, und die aminoternale Sequenz ist die gleiche wie in Beispiel 22 gezeigt.

Beispiel 24

Aminosäurezusammensetzung des 40 kDa TNF-Inhibitors

Die komplette Aminosäurezusammensetzung des U937-hergestellten, reifen 40kDa TNF-Inhibitors wurde analysiert durch das PTC-Aminosäureanalysesystem. Die tatsächlichen und vorhergesagten Daten der Zusammensetzung für den vollständigen reifen 40kDa TNF-Inhibitor, wie in Fig.38 gezeigt, sind in Tabelle 6 gezeigt.

Beispiel 25

Herstellung von chemisch modifizierten TNF-Inhibitoren

Um die Halbwertszeit der TNF-Inhibitoren in Plasma zu erhöhen, können TNF-Inhibitoren, die mit Polyethylenglycol (PEG) chemisch modifiziert sind, hergestellt werden. Die Modifikation kann durch Verknüpfen von PEG mit einem Cysteinrest des TNF-Inhibitormoleküls erfolgen. Da alle Cysteinreste der TNF-Inhibitoren Disulfid bilden, können mutierte TNF-Inhibitoren konstruiert werden, die einen zusätzlichen Cysteinrest an dem Aminoterminus, Glycosylierungsstellen und den Carboxyterminus eines jeden Inhibitors enthalten. Die Mutagenisierung kann mittels PCR ausgeführt werden unter Verwendung von Oligonucleotiden, die die gewünschte Mutation enthalten. Wie für den 30 kDa TNF-Inhibitor wurde ein zusätzlicher Cysteinrest bei dem Rest Nr. 1, 14 oder 105 zugefügt. Diese mutierten Proteine wurden in *E. coli* exprimiert unter Verwendung der gleichen Systeme, wie in Beispielen 7, 22 und 23 beschrieben, zu aktivem TNF-Inhibitor rückgefaltet. Die mutierten Proteine sind so aktiv wie die nicht mutierten Proteine. Die Verknüpfung mit PEG (pegylation) dieser Proteine wird durchgeführt, und die Aktivität wird beurteilt. Die 40kDa Mutanten werden wie oben konstruiert, und die Verknüpfung mit PEG wird durchgeführt, um aktive Proteine zu erhalten und die Stabilität des TNF-Inhibitors zu steigern.

Tabelle 6

	Berechnet aus der DNA-Sequenz	Experimentell #
Asx	14	13,0
Glx	23	22,6
Ser	25	23,2
Gly	14	17,8
His	4	4,5
Thr	26	23,9
Ala	17	17
Arg	14	15,1
Pro	26	22,3
Val	13	8,7
Ile	4	3,4
Leu	10	8,6
Phe	5	4,6
Lys	6	5,4
Tyr	5	5,0
Trp	3	ND
Met	3	ND
Cys	22	ND

ND: nicht bestimmt

Es versteht sich, daß die Anwendung der Lehren in dieser Erfindung auf ein spezielles Expressionssystem innerhalb der Fähigkeiten eines Fachmanns liegt angesichts der hierin enthaltenen Lehren. Somit ist es für einen Fachmann offensichtlich, daß verschiedene Modifikationen und Variationen bei den Verfahren und Produkten der vorliegenden Erfindung gemacht werden können. Es ist beabsichtigt, daß die vorliegende Erfindung diese Modifikation und Variationen umfaßt, vorausgesetzt sie fallen in den Bereich der anhängenden Ansprüche und ihrer Äquivalente.

23-10-90

- 26 -

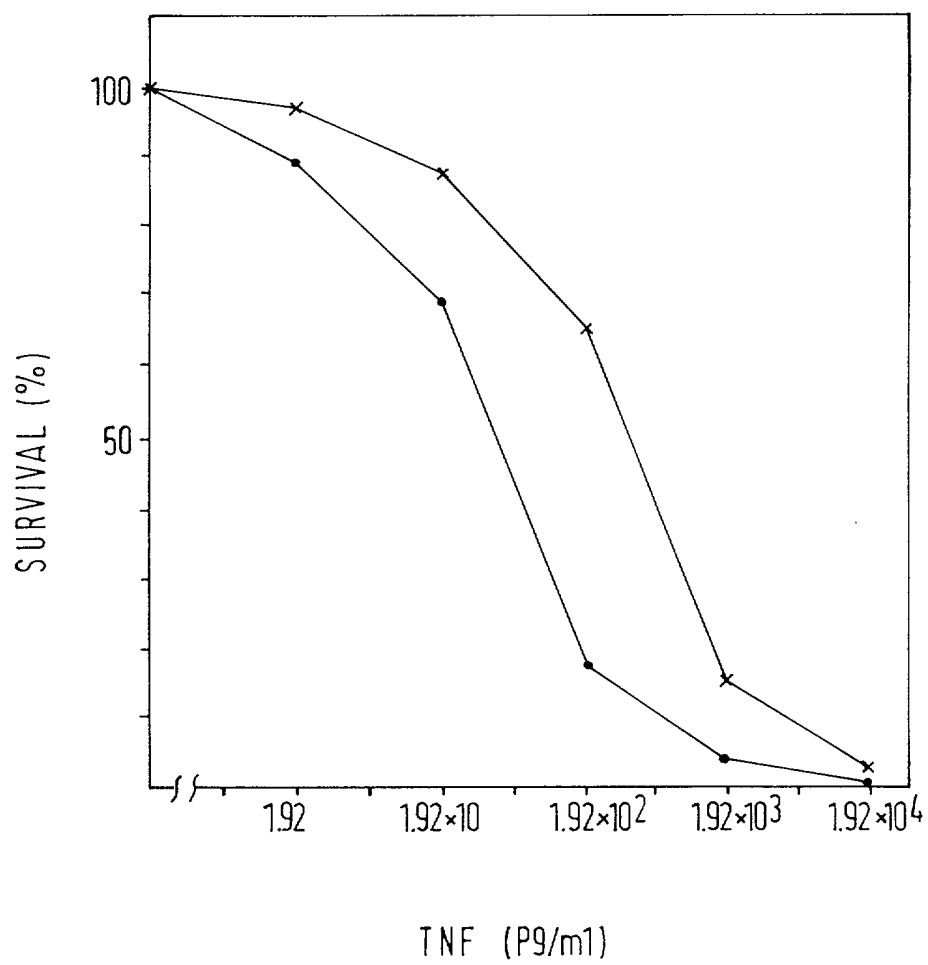


FIG. 1

23.10.90

- 27 -

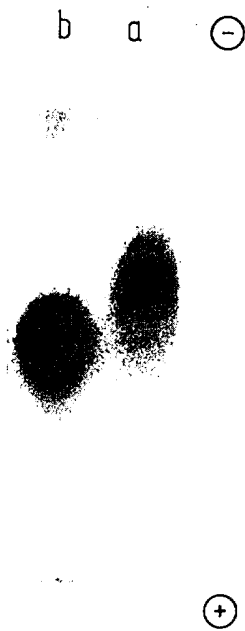


FIG. 2

22.10.90

- 28 -

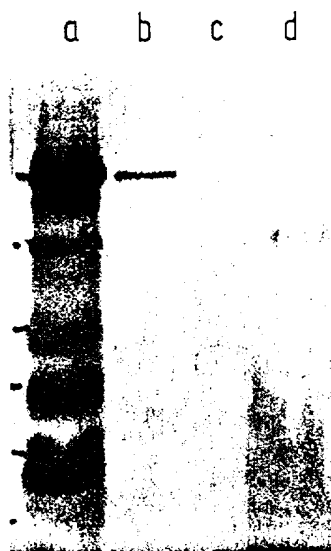


FIG. 3

10-10-90

- 29 -

a b c d



FIG. 4

20.10.90

- 30 -

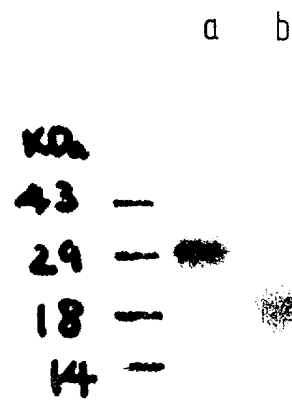


FIG. 5

23-10-90

- 31 -

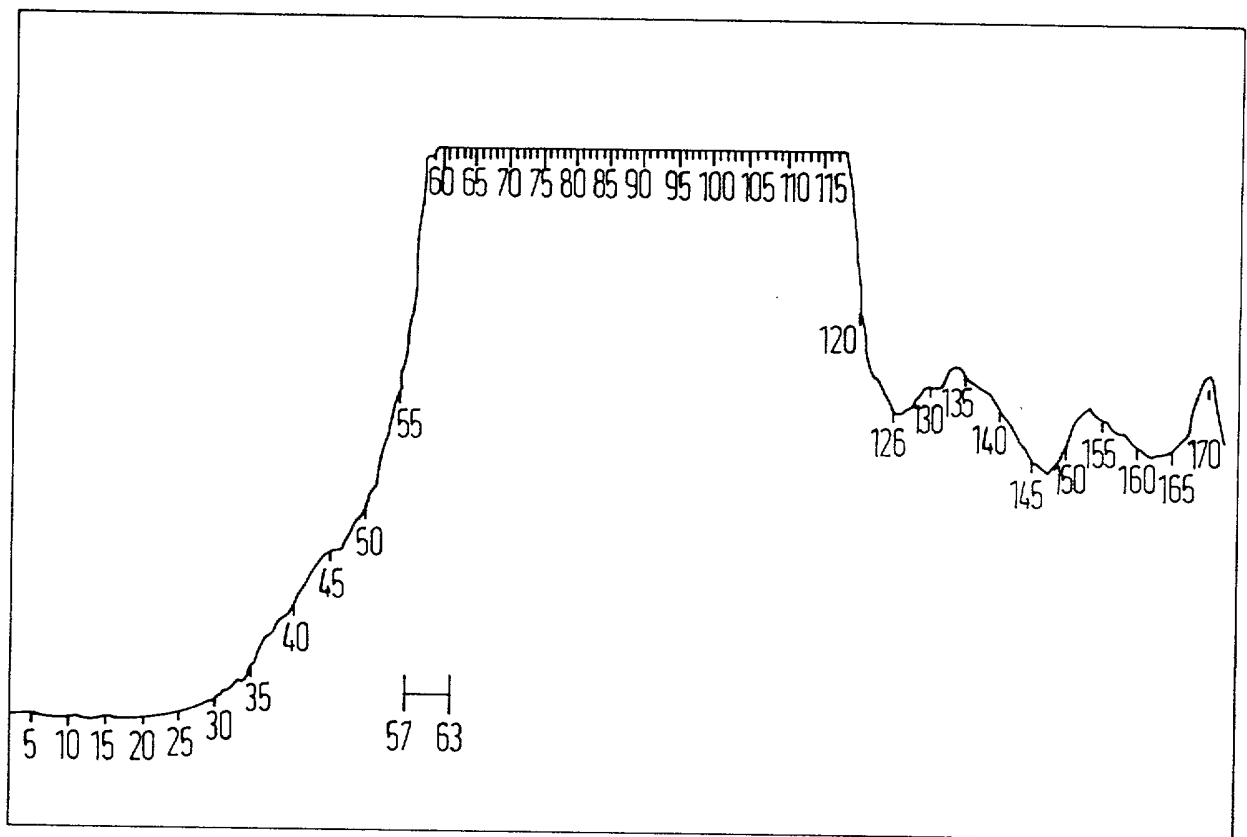


FIG. 6 A

23-10-91

- 32 -

45 47 49 51 53 55 57 59 61 63 65



FIG. 6 B

23-10-91

- 33 -

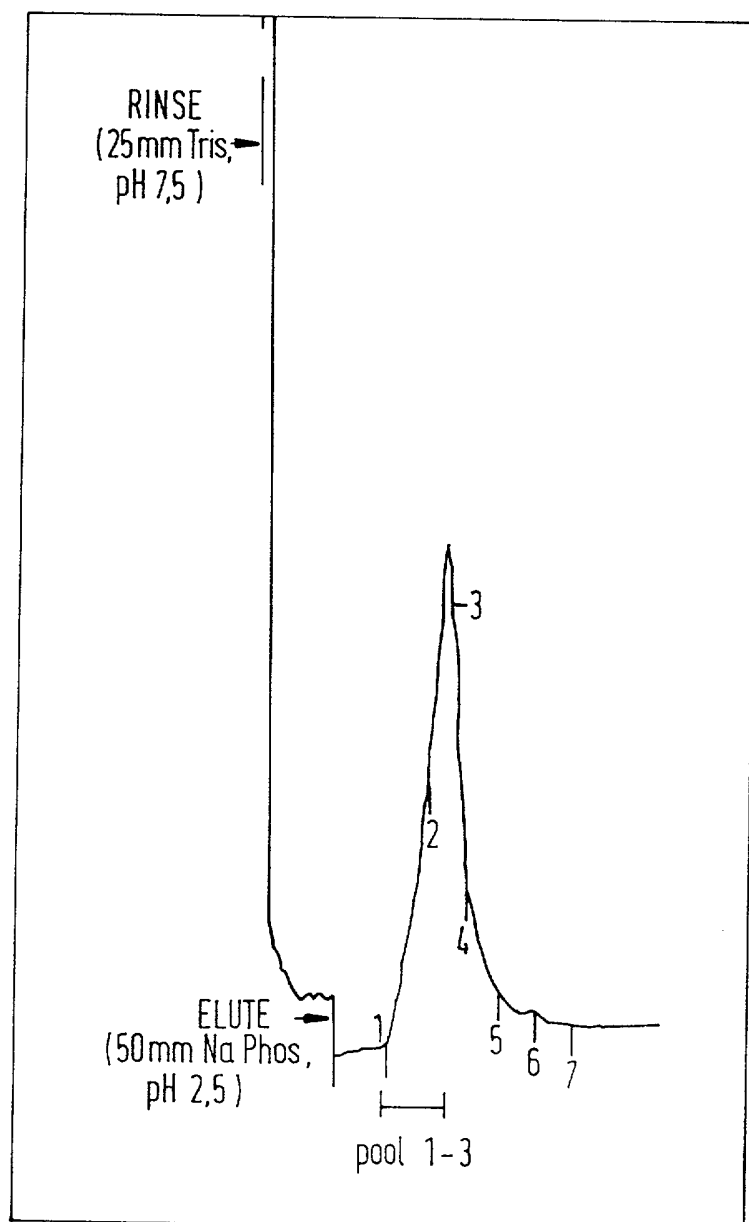


FIG. 7

23-10-91

- 34 -

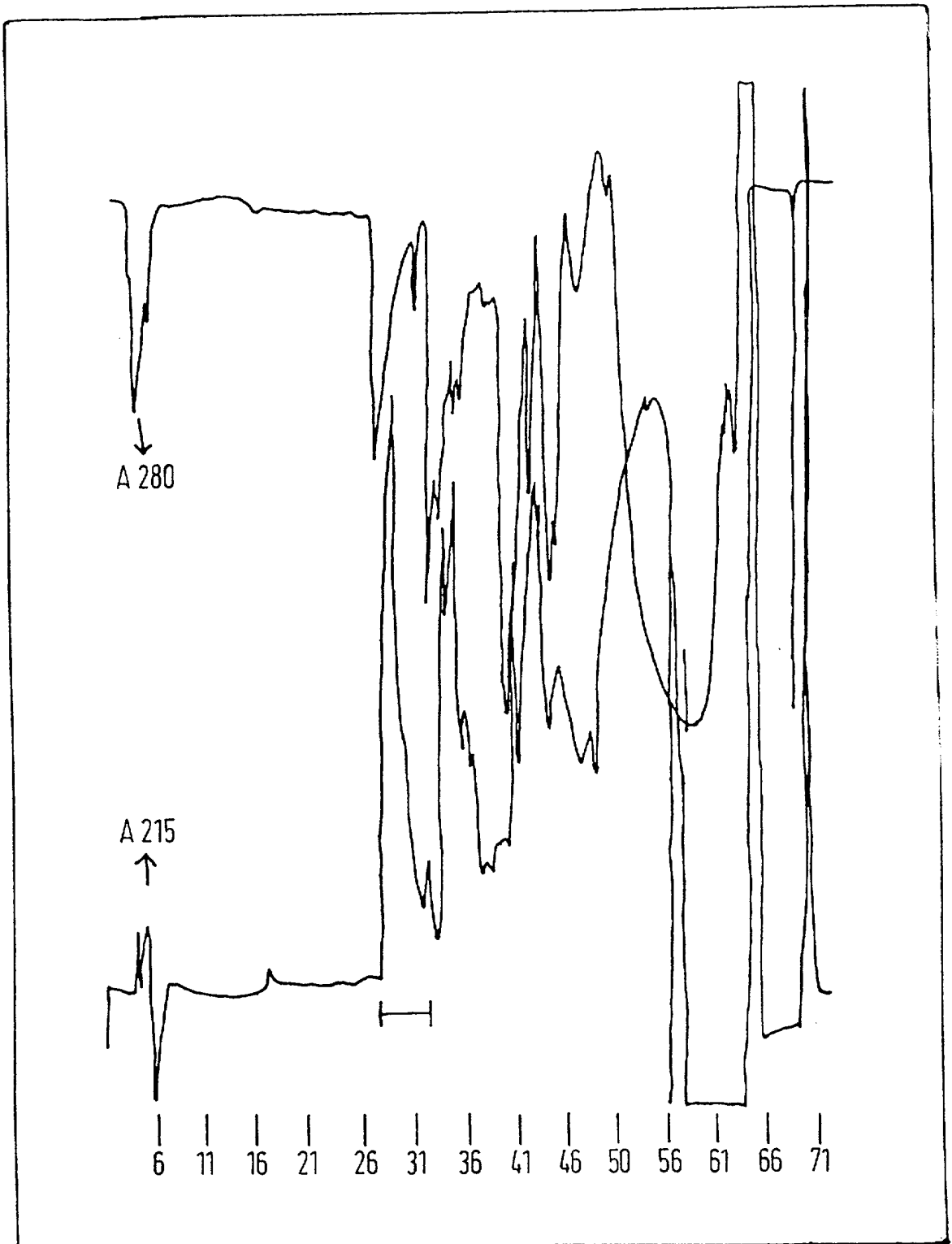


FIG. 8 A

23.10.90

- 35 -

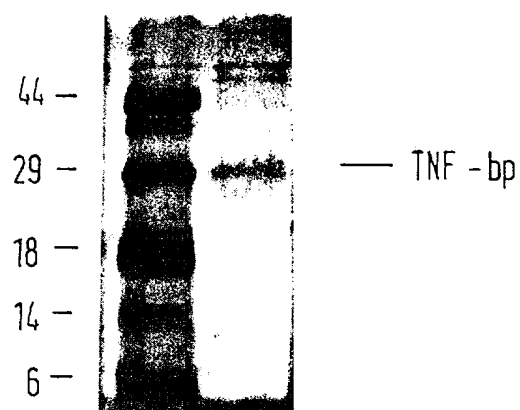


FIG. 8 B

23-10-90

-36-

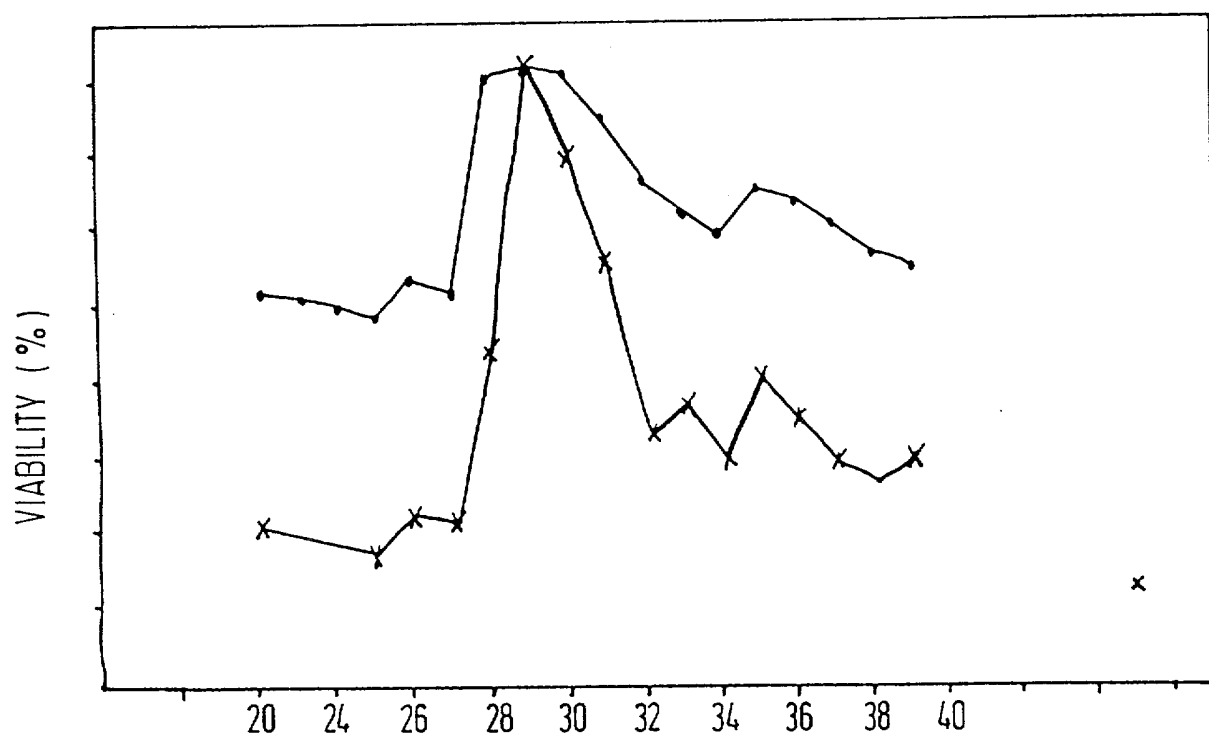


FIG. 8 C

23.10.90

- 37 -

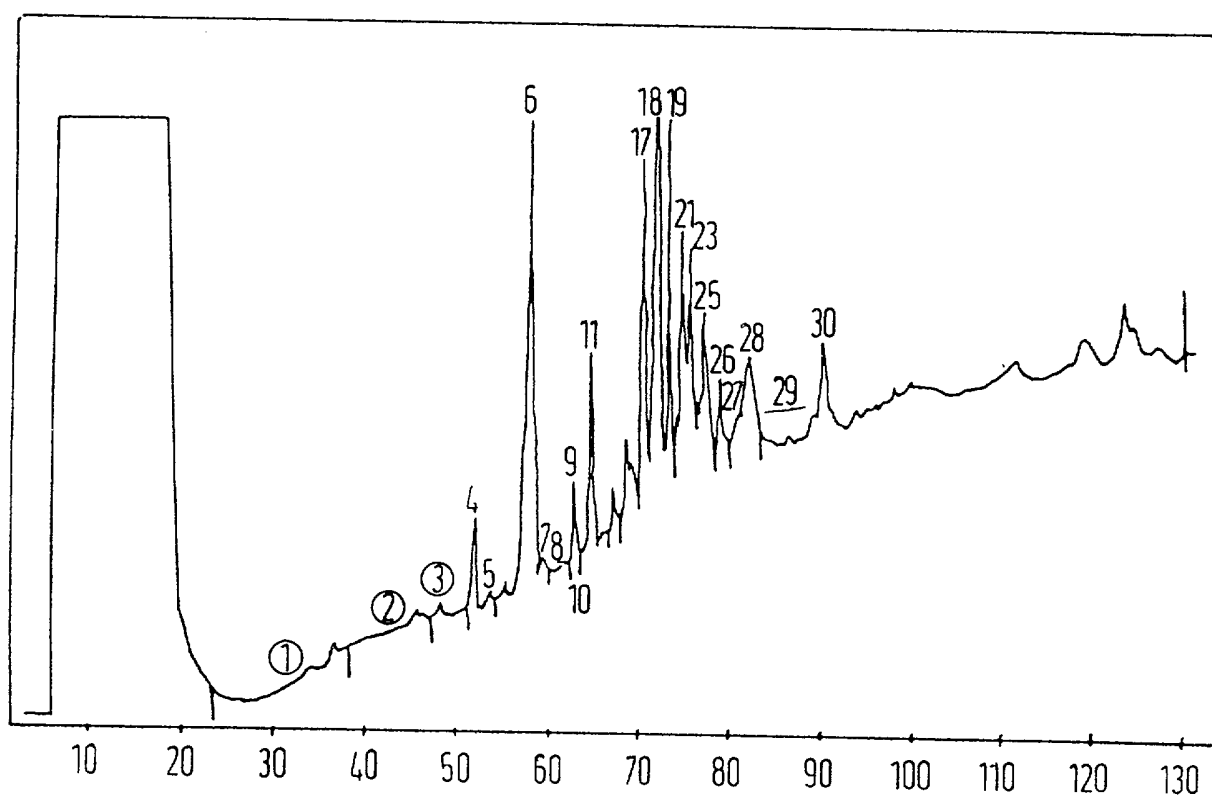


FIG. 9A

23.10.90

- 38 -

Alkylated *Lys - C digests of TNF - bp

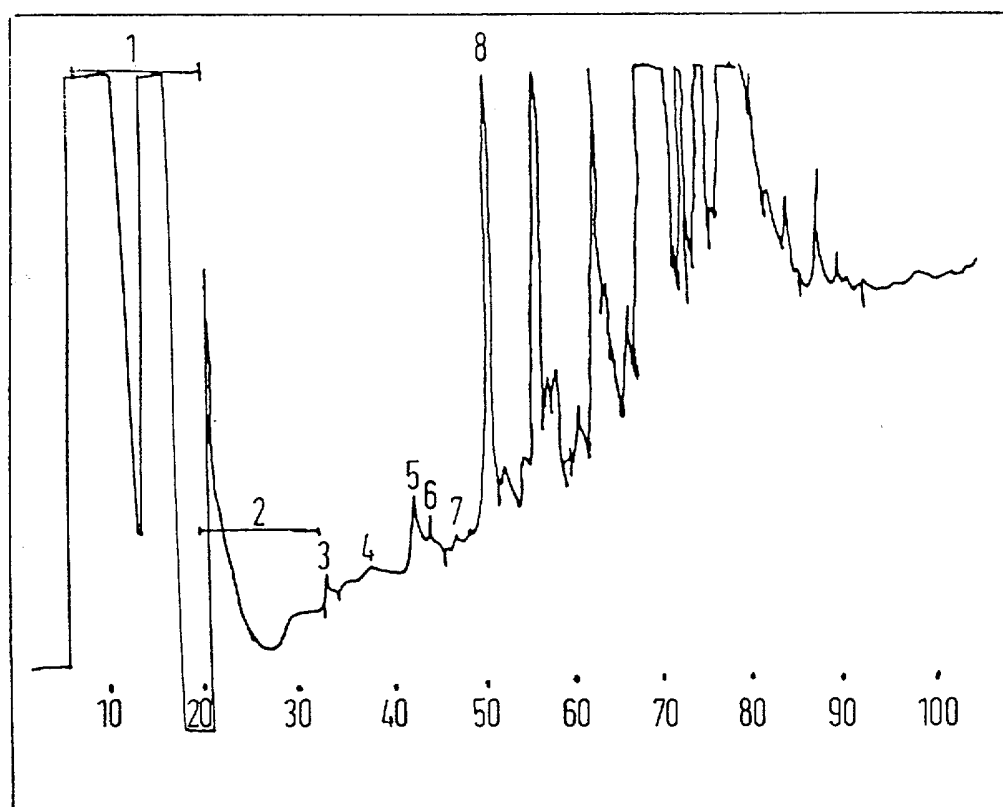


FIG. 9 B

23.10.90

- 39 -

Alkylated *Lys - C digests of TNF - bp
re - chromatograph
odds #23,25,27,33,37

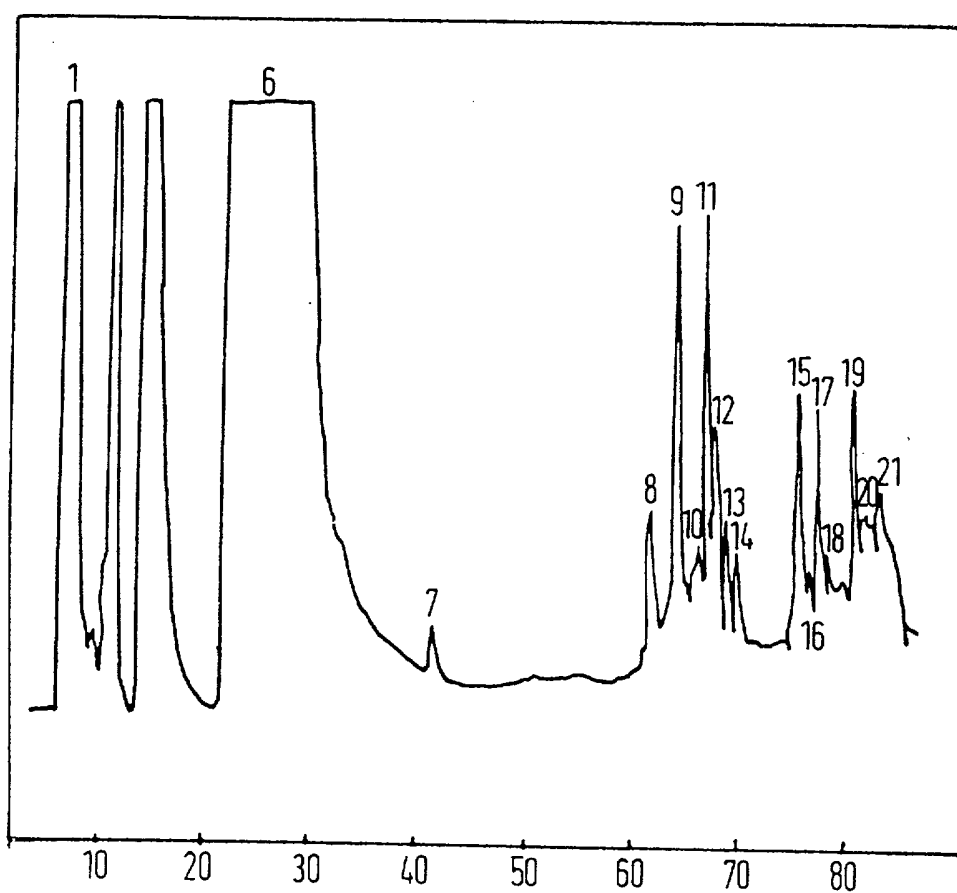


FIG. 9 B

23-10-90

- 40 -

Alkylated *Lys - C digests of TNF - bp
re - chromatograph
evens #24,26,28,32,36

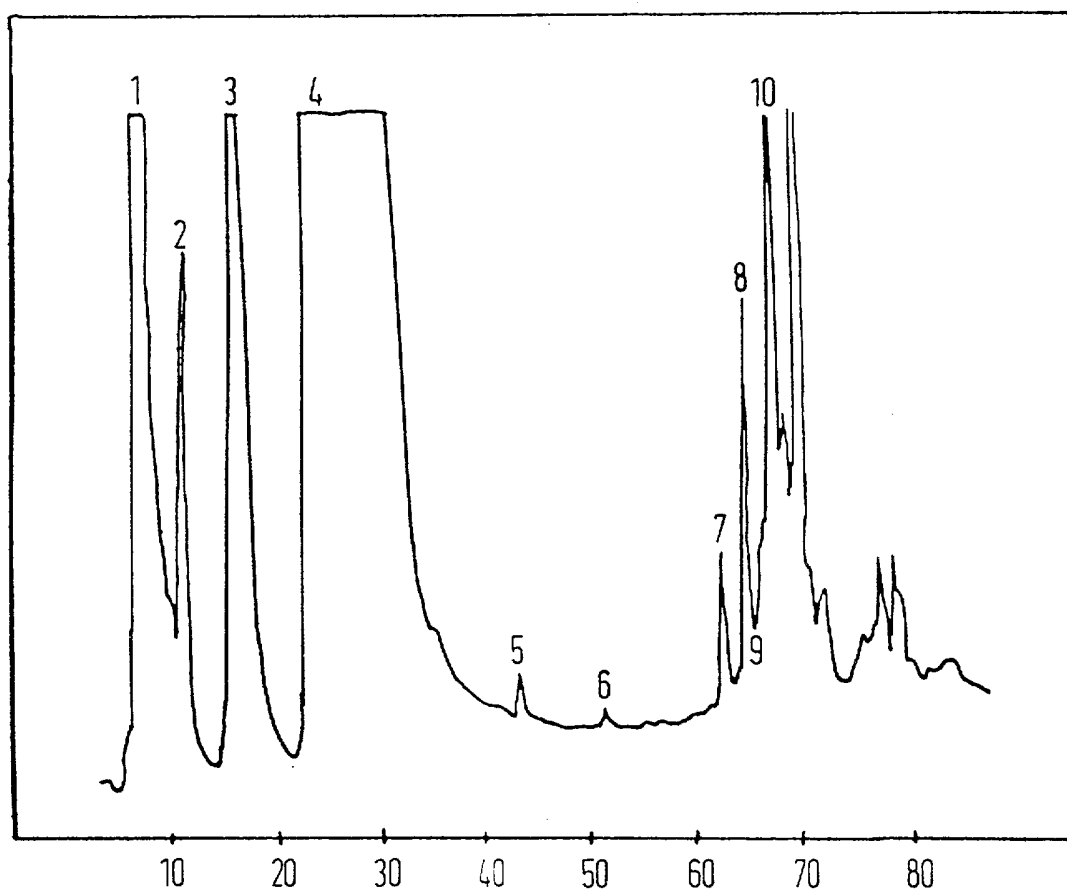


FIG. 9 B

23-10-90

- 41 -

#1

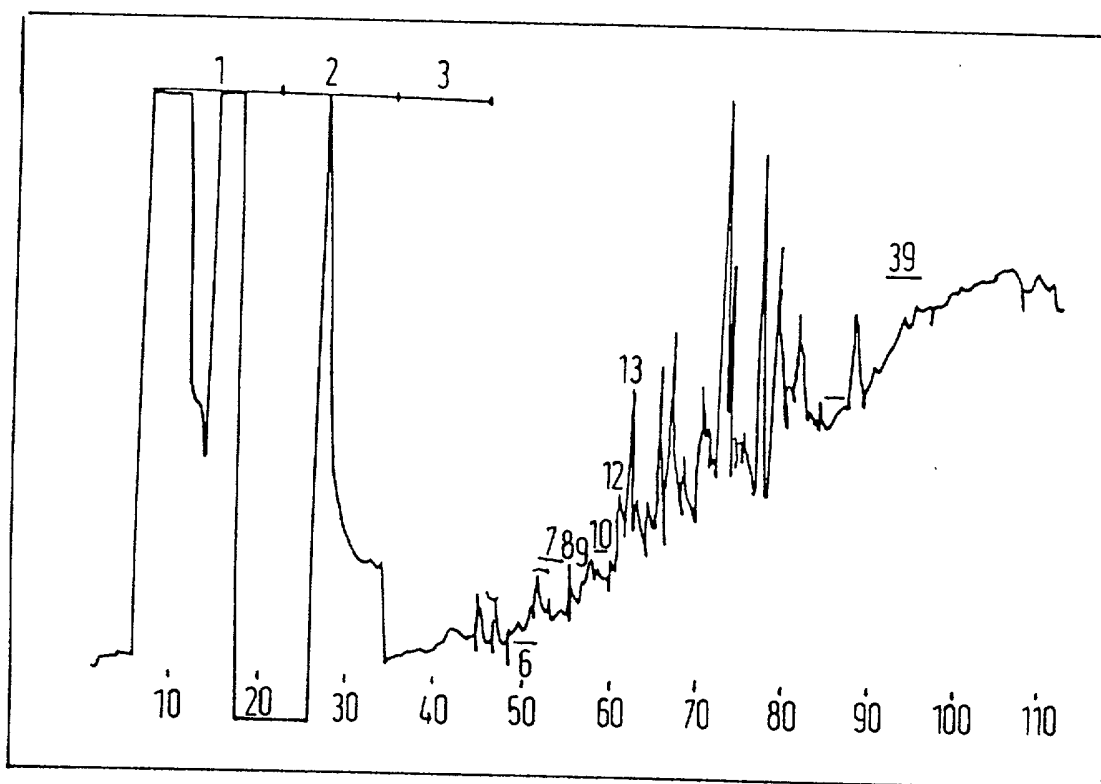


FIG. 10

23.10.90

- 42 -

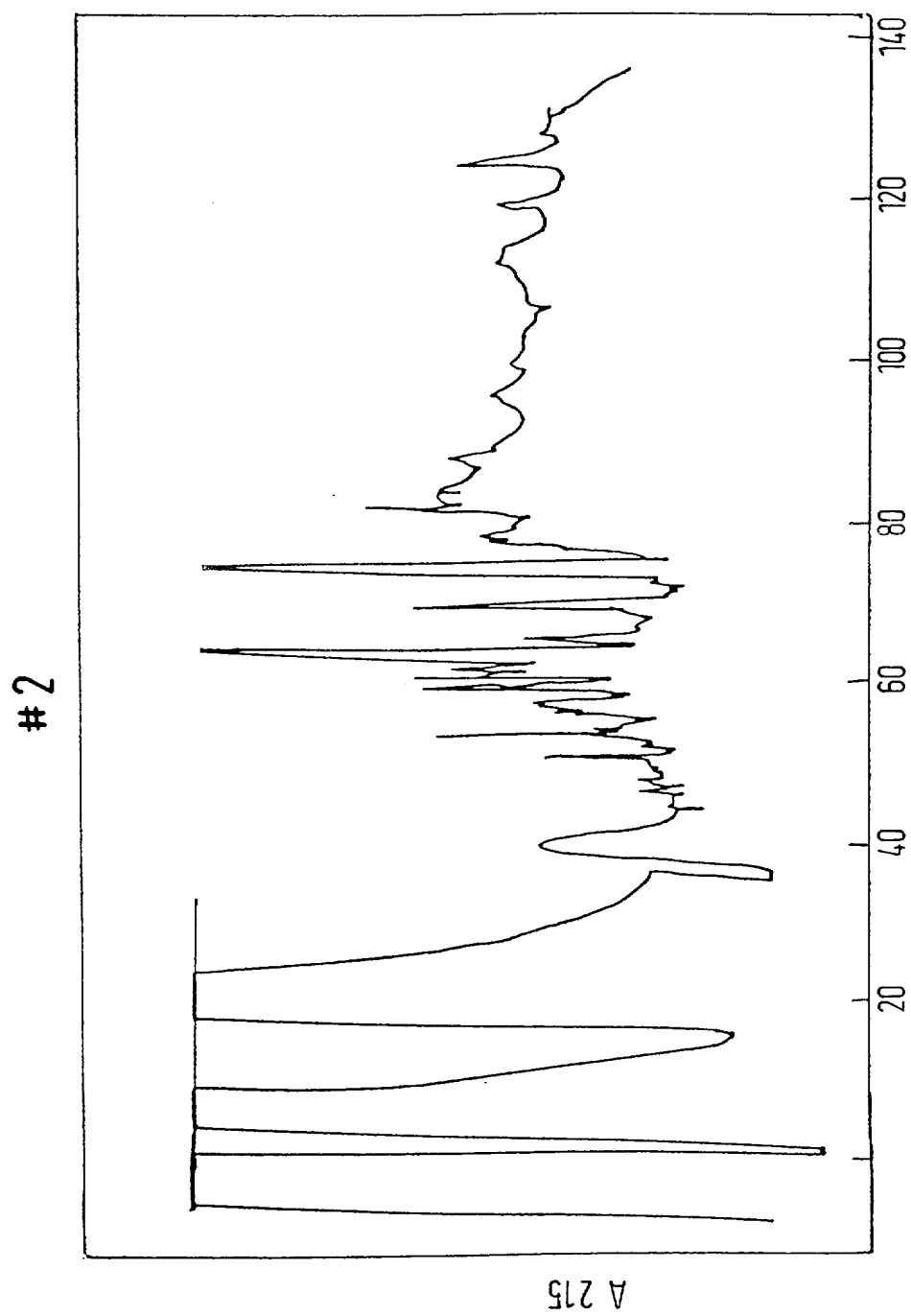


FIG. 10

20.10.90

- 43 -

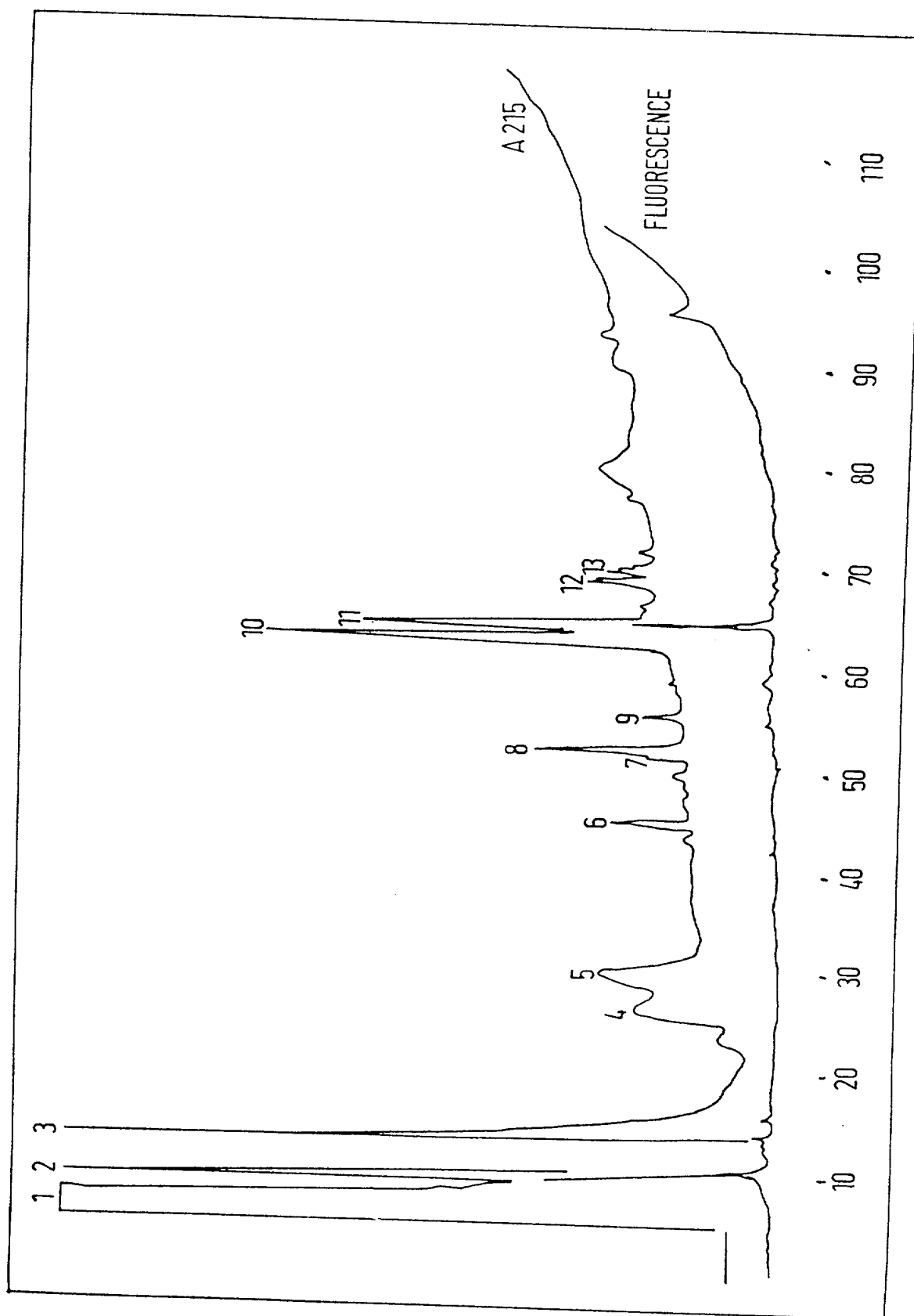


FIG. 11A

23-10-90

-44-

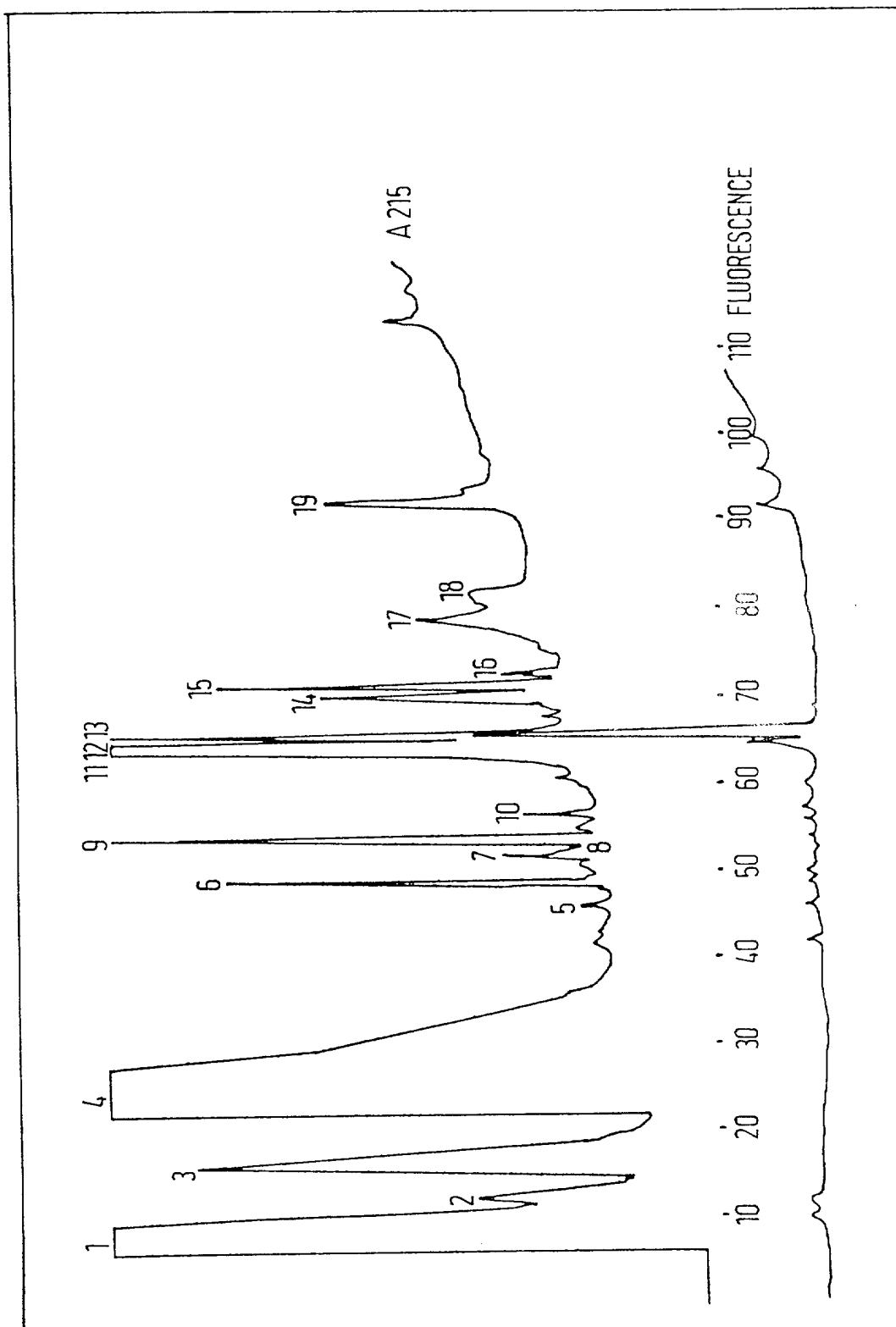


FIG. 11 B

23.10.90

- 45 -

20 40
 * * * * *
 A. D S V C P Q G K Y I H P Q N N S I C C T K C H K G T Y L Y N D C P G P G Q D T D
 60
 * * * * *
 C _ _ _ _ S G S F T A S E N H L R H C L S C S _ _ _ K
 * * * * *
 B. (E) K Q N T V C T C H A G F F L R E N E C V S C (L) N C (K) (K) (C) (L) (K) (E)
 * * * * *
 C. (K) E M G Q V E I S S C T V D R D T V C G C R K N (C) (Y) (R) (H) (Y)
 * * * * *
 D. (K) (S) L E C T K L C L P Q I E N
 (D)

FIG. 12

46

23.10.90

CATGCCTGCA GGTGACTCT AGAGGATCTG GGGCCTACTA GCTTTGAGTT GAGGGAACAA AAATGAACAC
 80 90 100 110 120 130 140
 ACAGGACAAC TAGAGAACAA TTAAGCATCA GATTGTATGC CCCAACTGTC TAAGTTTCAA GGAAGAAGTC
 150 160 170 180 190 200 210
 TAAACTTAGT GAGTGGCGTG GCCTGGGCGG AATGTTTCAC TGAGGAAGGA CTGAGCCAG GGAAGTTTAA
 220 230 240 250 260 270 280
 GATCTGCTAC CCCTAAGCTT CCCATCCCTC CCTCTCTTGA TGGTGTCTCC TCTATCTGAT TCTCCCCAG
 289 298 307 316 325 334
 GTG CTC CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC TCA GGG GTT ATT GGA CTG GTC
 Val Leu Leu Glu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val
 343 352 361 370 379 388
 CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA GAT AGT GTG TGT CCC CAA GGA AAA TAT
 Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr
 397 406 415 424 433 444
 ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC AAG TGC CAC AAA G GTAGGGCAA
 Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Ala
 454 464 474 484 494 504 514
 GTGGAAACGG TGAATGCCCT CAGGTCTGGG GTGCTGCTC TTTCTCTGCT TCTTCCAGTT GTTCTCCCT
 524 534 544 554 564 574 584
 AACTTTGCTG TCTCTCCTGG GCTGGGATTT TCTCCCTCCC TCCTCTCCTA GAGACTTCAG GGAATCCGCC
 594 604 614 624 634 644 654
 CTGGCTGTTG TCCCTAGCAT GGGGCTCCTT CTTTGTGTTT TCACCCGCAG CCTAACTCTG CGGCCCATTT
 664 673 682 691 700
 CA CA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC
 Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 709 718 727 736 745 754
 TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC
 Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His
 763 772 781 797 807 817
 TGC CTC AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GGTGAGTGT CACAGGCAGG AGAGTCAGGC
 Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys
 827 837 847 857 867 877 887
 GGGTCTTGAG TGGTGTGTGG GTGCCTGTCT ATGTGCAGGC TGGTGGGTGT GGGCAGGAAG GTGTGTGTTT
 897 907 917 927 937 947 957
 TGGTGGGACA CTGCATGGAT GTGAGTGTGT ATTACAGAGA CACACACTTA GGGGTATGTC AGGAAGGGGA
 967 977 987 997 1007 1016
 TGCAGGGACA GGAGGATCCA GGAATCATAC CCCATCTTCT CCCCTACCCA GAA ATG GGT CAG
 Glu MET Gly Gln
 1025

GTG GAG ATC
 Val Glu Ile

FIG. 13

- 47 - 23.10.90

1 10 20 30 40 50 60 70 80
DSVCPQGGKYIHPQNNNSICCTKCHKGTYLYNDPCPGPGQDTCRECESGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRDT
 90
VCGCRKN

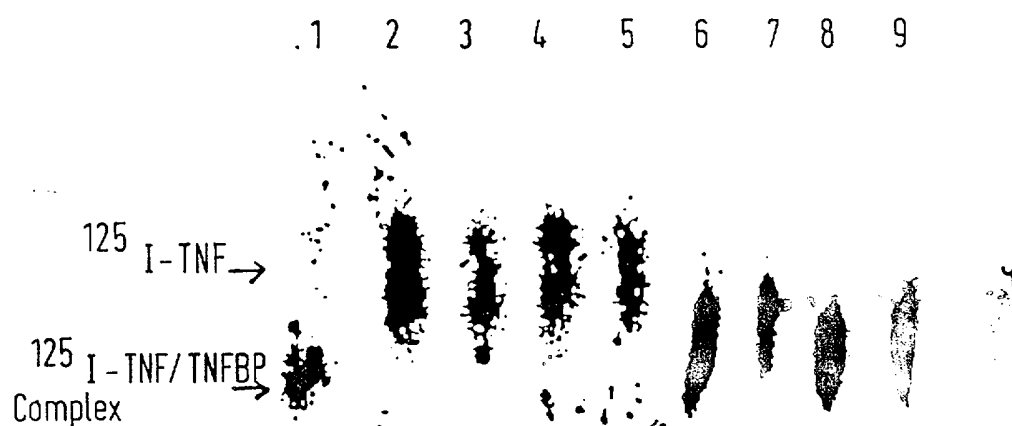
KQNTVCTCHAGFFLRENECVSC

LECTKLCLPQIEN

FIG. 14

- 48 -

28.10.90

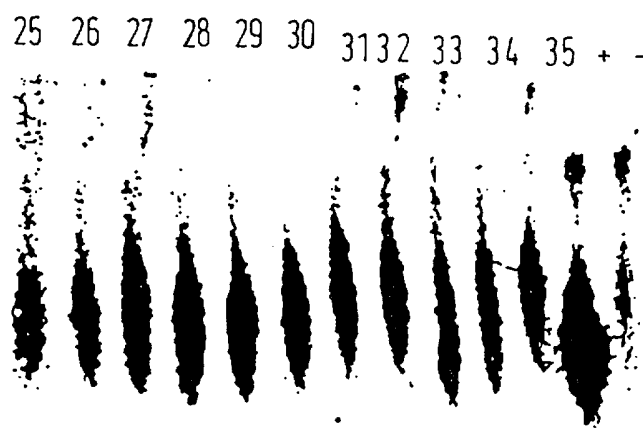


Lane 1 is a positive control. Purified TNF-BP complexed with $^{125}\text{I-TNF}$. Lane 2-5 are protein from the 24, 48, 72, and 96 hour incubations with PMA/PHA that did not bind to the TNF-affinity column. Lane 6-9 are the material from the same incubations that did bind to the TNF-affinity column.

FIG. 15

200-10-00

- 49 -



Fractions 27, 28 and 29, 33 and 34 show TNF binding activity. + is as lane 1 of figure 15. - is 125I-TNF alone.

FIG. 16

23.10.90

- 50 -

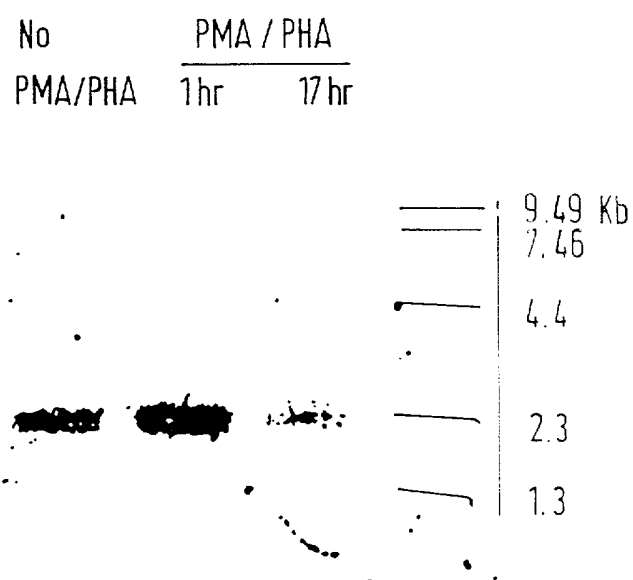


FIG. 17

23-10-90

- 51 -

11 21 51 12 22 52



11



12

FIG. 18

100 100 100

- 52 -

20 Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr
 40 Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 60 Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu
 80 Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 100 Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu
 120 Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 140 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val
 160 Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
 Asn

FIG. 19

296963

53-

												296			305				
												GAT	AGT	GTG	TGT	CCC	CAA		
												Asp	Ser	Val	Cys	Pro	Gln		
314				323				332				341				350		359	
GGA	AAA	TAT	ATC	CAC	CCT	CAA	AAT	AAT	TCG	ATT	TGC	TGT	ACC	AAG	TGC	CAC	AAA		
Gly	Lys	Tyr	Ile	His	Pro	Gln	Asn	Asn	Ser	Ile	Cys	Cys	Thr	Lys	Cys	His	Lys		
368				377				386				395				404		413	
GGA	ACC	TAC	TTG	TAC	AAT	GAC	TGT	CCA	GGC	CCG	GGG	CAG	GAT	ACG	GAC	TGC	AGG		
Gly	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Asn	Asp	Cys	Pro	Gly	Pro	Gly	Gln	Asp	Thr	Asp	Cys	Arg		
422				431				440				449				458		467	
GAG	TGT	GAG	AGC	GGC	TCC	TTC	ACC	GCT	TCA	GAA	AAC	CAC	CTC	AGA	CAC	TGC	CTC		
Glu	Cys	Glu	Ser	Gly	Ser	Phe	Thr	Ala	Ser	Glu	Asn	His	Leu	Arg	His	Cys	Leu		
476				485				494				503				512		521	
AGC	TGC	TCC	AAA	TGC	CGA	AAG	GAA	ATG	GGT	CAG	GTG	GAG	ATC	TCT	TCT	TGC	ACA		
Ser	Cys	Ser	Lys	Cys	Arg	Lys	Glu	MET	Gly	Gln	Val	Glu	Ile	Ser	Ser	Cys	Thr		
530				539				548				557				566		575	
GTG	GAC	CGG	GAC	ACC	GTG	TGT	GGC	TGC	AGG	AAG	AAC	CAG	TAC	CGG	CAT	TAT	TGG		
Val	Asp	Arg	Asp	Thr	Val	Cys	Gly	Cys	Arg	Lys	Asn	Gln	Tyr	Arg	His	Tyr	Trp		
584				593				602				611				620		629	
AGT	GAA	AAC	CTT	TTC	CAG	TGC	TTC	AAT	TGC	AGC	CTC	TGC	CTC	AAT	GGG	ACC	GTG		
Ser	Glu	Asn	Leu	Phe	Gln	Cys	Phe	Asn	Cys	Ser	Leu	Cys	Leu	Asn	Gly	Thr	Val		
638				647				656				665				674		683	
CAC	CTC	TCC	TGC	CAG	GAG	AAA	CAG	AAC	ACC	GTG	TGC	ACC	TGC	CAT	GCA	GGT	TTC		
His	Leu	Ser	Cys	Gln	Glu	Lys	Gln	Asn	Thr	Val	Cys	Thr	Cys	His	Ala	Gly	Phe		
692				701				710				719				728		737	
TTT	CTA	AGA	GAA	AAC	GAG	TGT	GTC	TCC	TGT	AGT	AAC	TGT	AAG	AAA	AGC	CTG	GAG		
Phe	Leu	Arg	Glu	Asn	Glu	Cys	Val	Ser	Cys	Ser	Asn	Cys	Lys	Lys	Ser	Leu	Glu		
746				755				764											
TGC	ACG	AAG	TTG	TGC	CTA	CCC	CAG	ATT	GAG	AAT									
Cys	Thr	lys	Leu	Cys	Leu	Pro	Gln	Ile	Glu	Asn									

FIG. 20

- 54 -

10 20 30 40 50 60 70
 GATCACTGGG ACCAGGCGT GATCTCTATG CCCGAGTCTC AACCTCAAC TGTCACCCCA AGGCACTGG

80 90 100 110 120 130 140
 GACGTCTGG ACAGACCGAG TCCCGGGAAG CCCCAGCACT GCCGCTGCCA CACTGCCCTG AGCCCCAATG

150 160 171 180 189 198
 GGGGAGTGAG AGGCCATAGC TGTCTGGC ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG
 MET Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu

207 216 225 234 243 252
 CTG CCG CTG GTG CTC CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC TCA GGG GTT ATT
 Leu Pro Leu Val Leu Leu Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile

261 270 279 288 297 306
 GGA CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA GAT AGT GTG TGT CCC CAA
 Gly Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro Gln

315 324 333 342 351 360
 GGA AAA TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC AAG TGC CAC AAA
 Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys

369 378 387 396 405 414
 GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG
 Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg

423 432 441 450 459 468
 GAG TGT GAG AGC GGC TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC CTC
 Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu

477 486 495 504 513 522
 AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA
 Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu MET Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr

531 540 549 558 567 576
 GTG GAC CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT TGG
 Val Asp Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp

585 594 603 612 621 630
 AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC AAT TGC AGC CTC TGC CTC AAT GGG ACC GTG
 Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val

639 648 657 666 675 684
 CAC CTC TCC TGC CAG GAG AAA CAG AAC ACC GTG TGC ACC TGC CAT GCA GGT TTC
 His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe

FIG. 21

- 55 -

693	702	711	720	729	738
TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG					
Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu					
747	750	765	774	783	792
TGC ACG AAG TTG TGC CTA CCC CAG ATT GAG AAT GTT AAG GGC ACT GAG GAC TCA					
Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser					
801	810	819	828	837	846
GGC ACC ACA GTG CTG TTG CCC CTG GTC ATT TTC TTT GGT CTT TGC CTT TTA TCC					
Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu Leu Ser					
855	864	873	882	891	900
CTC CTC TTC ATT GGT TTA ATG TAT CGC TAC CAA CGG TGG AAG TCC AAG CTC TAC					
Leu Leu Phe Ile Gly Leu MET Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys Ser Lys Leu Tyr					
909	918	927	936	945	954
TCC ATT GTT TGT GGG AAA TCG ACA CCT GAA AAA GAG GGG GAG CTT GAA GGA ACT					
Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu Gly Glu Leu Glu Gly Thr					
963	972	981	990	999	1008
ACT ACT AAG CCC CTG GCC CCA AAC CCA AGC TTC AGT CCC ACT CCA GGC TTC ACC					
Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr					
1017	1026	1035	1044	1053	1062
CCC ACC CTG GGC TTC AGT CCC GTG CCC AGT TCC ACC TTC ACC TCC AGC TCC ACC					
Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr					
1071	1080	1089	1098	1107	1116
TAT ACC CCC GGT GAC TGT CCC AAC TTT GCG GCT CCC CGC AGA GAG GTG GCA CCA					
Tyr Thr Pro Gly Asp Cys Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro					
1125	1134	1143	1152	1161	1170
CCC TAT CAG GGG GCT GAC CCC ATC CTT GCG ACA GCC CTC GCC TCC GAC CCC ATC					
Pro Tyr Gln Gly Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile					
1179	1188	1197	1206	1215	1224
CCC AAC CCC CTT CAG AAG TGG GAG GAC AGC GCC CAC AAG CCA CAG AGC CTA GAC					
Pro Asn Pro Leu Gln Lys Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser Leu Asp					
1233	1242	1251	1260	1269	1278
ACT GAT GAC CCC GCG ACG CTG TAC GCC GTG GTG GAG AAC GTG CCC CCG TTG CGC					
Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro Leu Arg					
1287	1296	1305	1314	1323	1332
TGG AAG GAA TTC GTG CGG CGC CTA GGG CTG AGC GAC CAC GAG ATC GAT CGG CTG					
Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu Ser Asp His Glu Ile Asp Arg Leu					

FIG. 21 continued

- 56 -

28-10-90

1341	1350	1359	1368	1377	1386
GAG CTG CAG AAC GGG CGC TGC CTG CGC GAG GCG CAA TAC AGC ATG CTG GCG ACC					
Glu Leu Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln Tyr Ser MET Leu Ala Thr					
1395	1404	1413	1422	1431	1440
TGG AGG CCG CGC ACG CCG CCG CGC GAG GCC ACG CTG GAG CTG CTG GGA GCG GTG					
Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg Arg Glu Ala Thr Leu Glu Leu Leu Gly Arg Val					
1449	1458	1467	1476	1485	1494
CTC CGC GAC ATG GAC CTG CTG GGC TGC CTG GAG GAC ATC GAG GAG GCG CTT TGC					
Leu Arg Asp MET Asp Leu Leu Gly Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala Leu Cys					
1503	1512	1521	1530	1546	1556
GGC CCC GGC GGC CTC CCG CCC GCG CCC AGT CTT CTC AGA TGA GGCTGCGCCC CTGCGGGCAG					
Gly Pro Ala Ala Leu Pro Pro Ala Pro Ser Leu Leu Arg					
1566	1576	1586	1596	1606	1626
CTCTAAGGAC CGTCCTGCGA GATCGCCTTC CAACCCCACT TTTTCTGGA AAGGAGGGGT CCTGCAGGGG					
1636	1646	1656	1666	1676	1696
CAAGCAGGAG CTAGCAGCCG CCTACTTGGT GCTAACCCCT CGATGTACAT AGCTTTTCTC AGCTGCCTGC					
1706	1716	1726	1736	1746	1766
GCGCCGCCGA CAGTCAGCGC TGTGCGCGCG GAGAGAGGTG CGCCGTGGGC TCAAGAGCCT GAGTGGGTGG					
1776	1786	1796	1806	1816	1836
TTTGCGAGGA TGAGGGACGC TATGCCTCAT GCCCGTTTTG GGTGTCTCA CCAGCAAGGC TGCTCGGGGG					
1846	1856	1866	1876	1886	1906
CCCCTGGTTC GTCCTGAGC CTTTTTCACA GTGCATAAGC AGTTTTTTTT GTTTTTGTTT TGTTTTGTTT					
1916	1926	1936	1946	1956	1976
TGTTTTTAAA TCAATCATGT TACACTAATA GAAACTTGGC ACTCCTGTCC CCTCTGCCTG GACAAGCACA					
1986	1996	2006	2016	2026	2046
TAGCAAGCTG AACTGTCTTA AGGCAGGGGC GAGCACGGAA CAATGGGGCC TTCAGCTGGA GCTGTGGACT					
2056	2066	2076	2086		
TTTGTACATA CACTAAAATT CTGAAGTTAA AGCTCAAAAA AA					

FIG. 21 continued

GA ATT CCA CAA CGG TTT CCC TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT

Start gene 10 protein sequence

ATG GCT AGC ATG ACT GGT GGA CAG CAA ATG GGT ACG GAT CCG ATC TTG GAG GAT GAT TAA
Met Ala Ser Met Thr Gly Gly Gln Gln Met Gly Thr Asp Pro Ile Leu Glu Asp Asp stop
Translational coupler

ATG GAC AGC GTT TGC CCC
Met Asp Ser Val Cys Pro
Start TNF inhibitor sequence

FIG. 22

2010-09-01

- 58 -

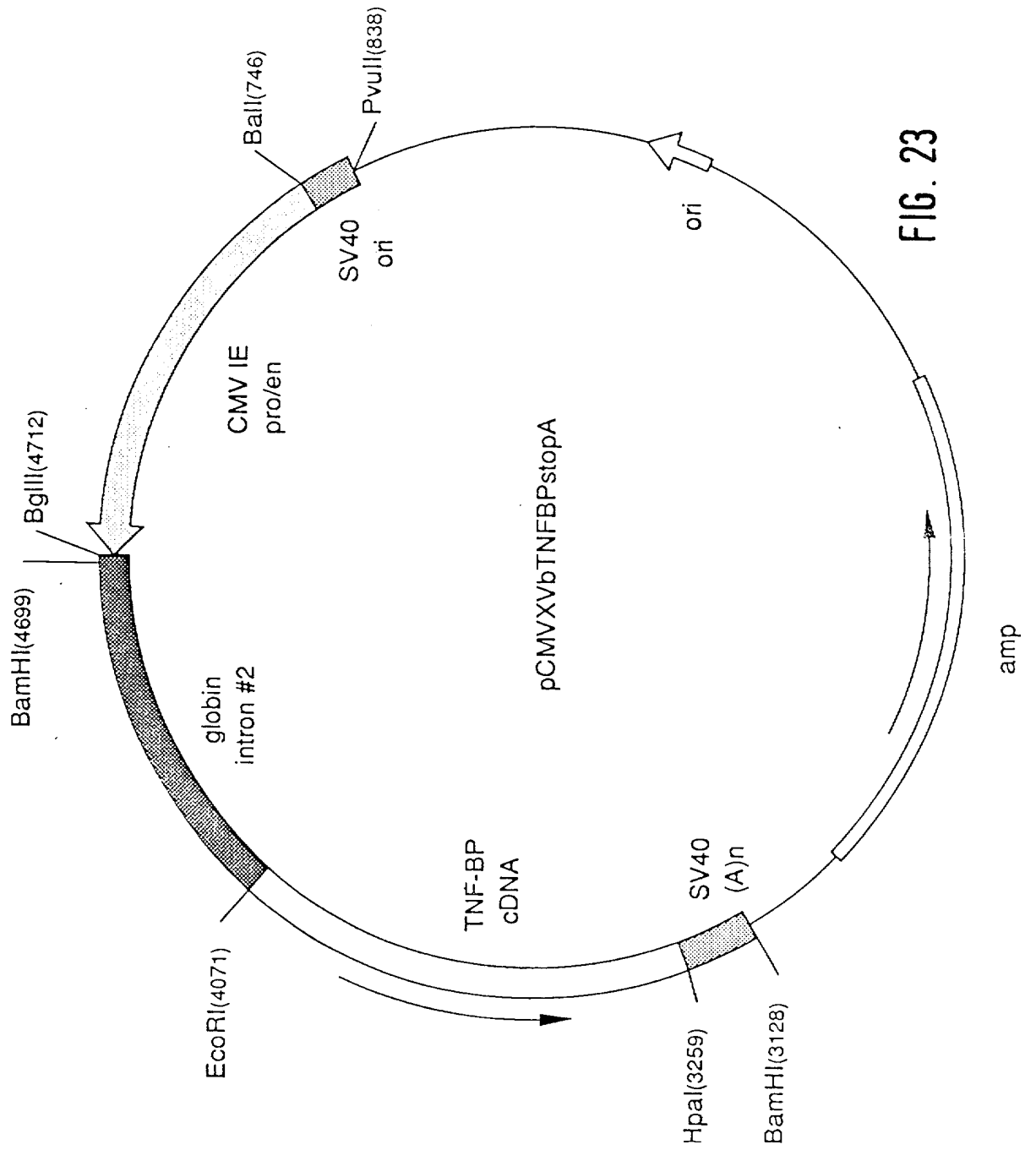


FIG. 23

23.10.90

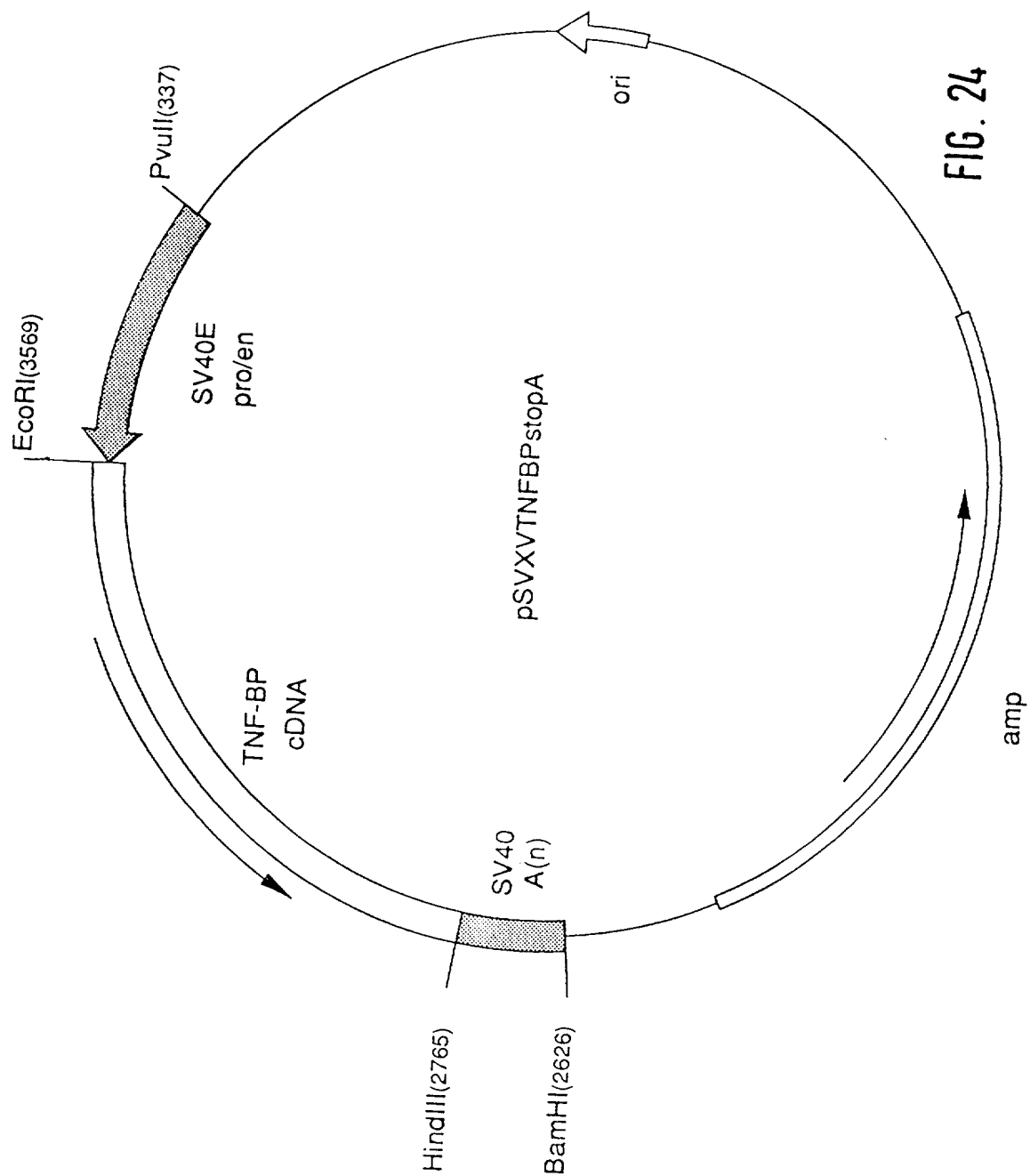


FIG. 24

23.10.90

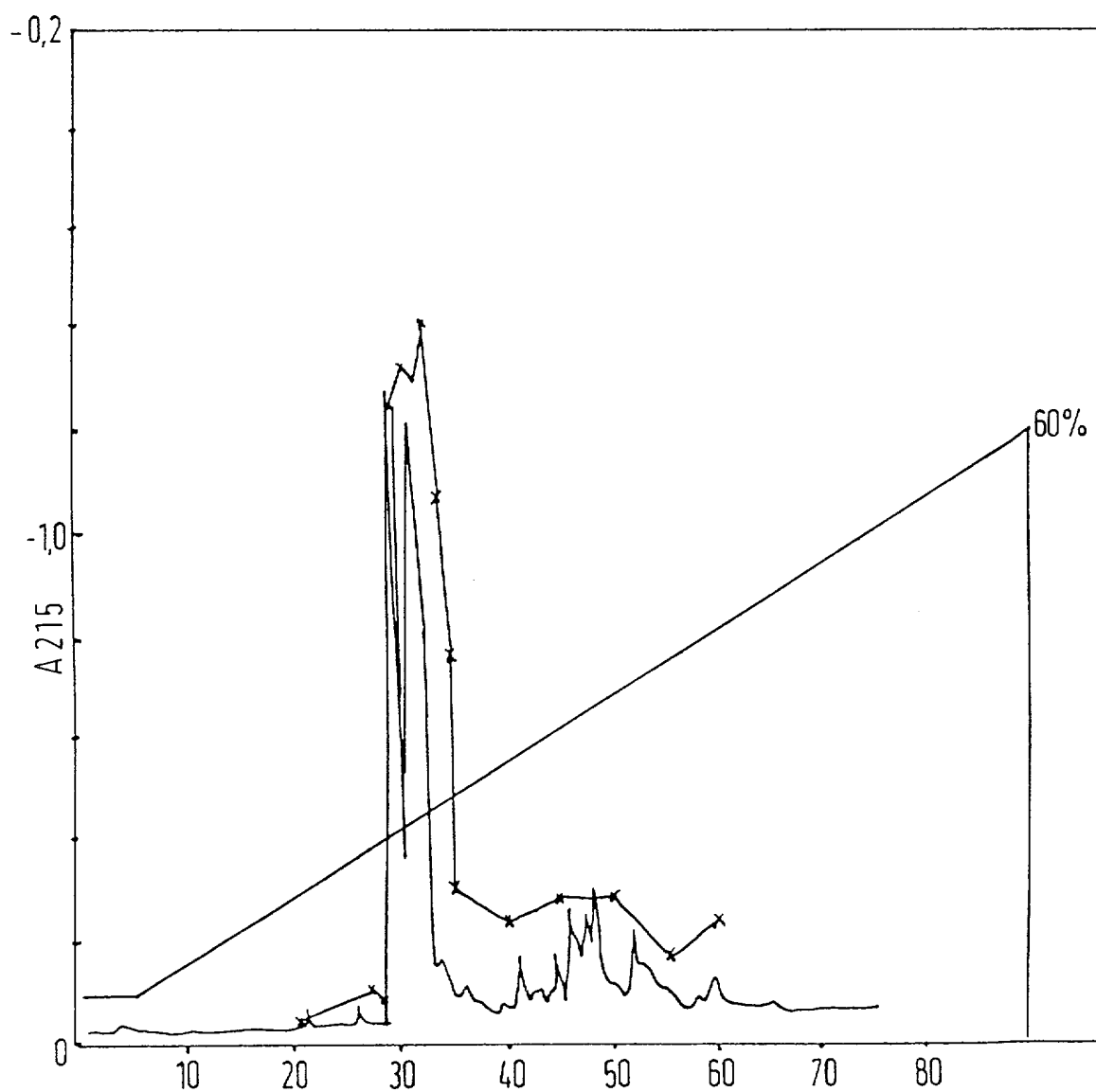


FIG. 25

23-10-90

- 61 -

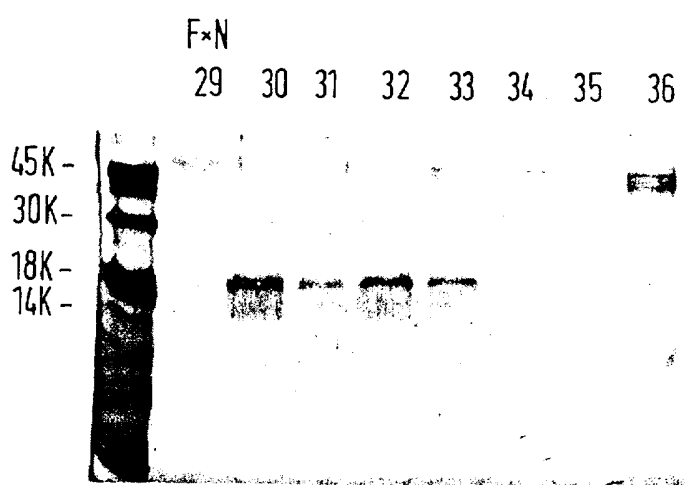


FIG. 26

10 07 07 91

- 62 -

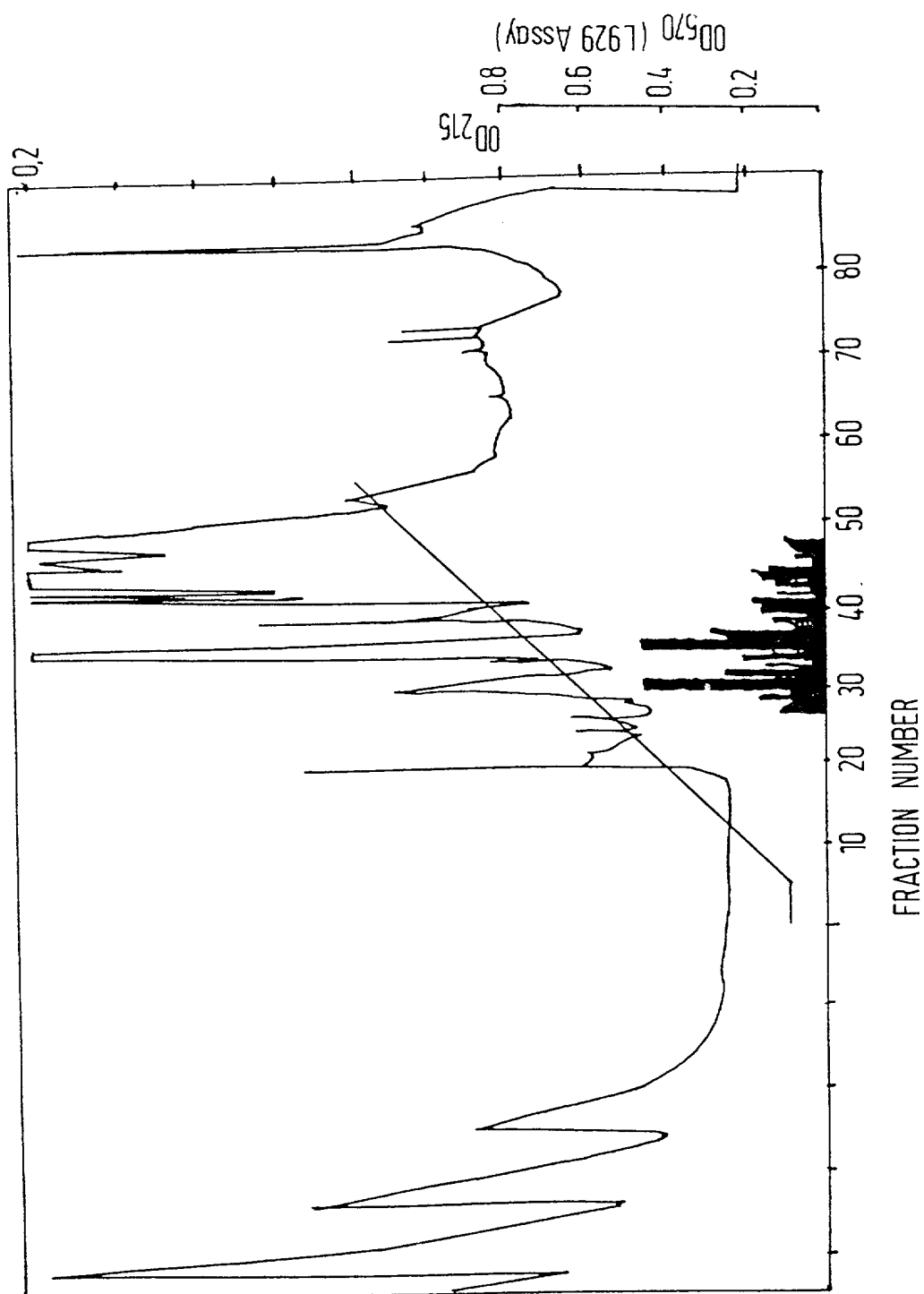


FIG. 27

23.10.90

- 63 -

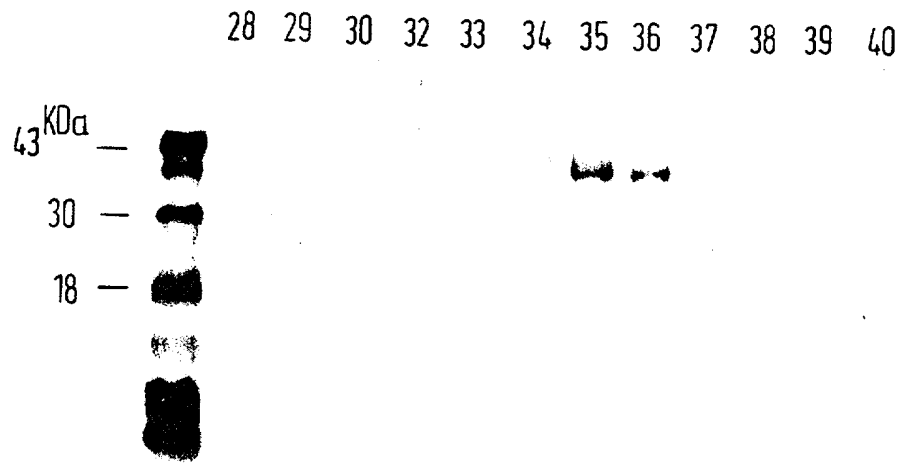


FIG. 28

23.10.90

- 64 -

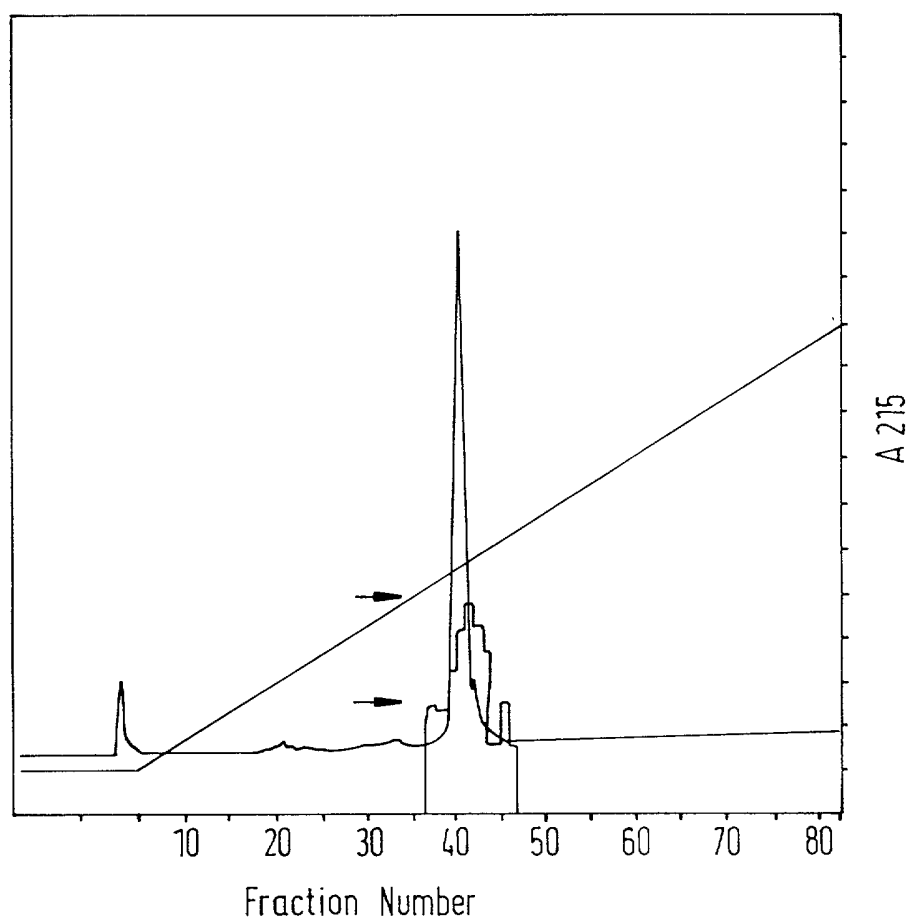


FIG. 29

03.10.90

- 65 -

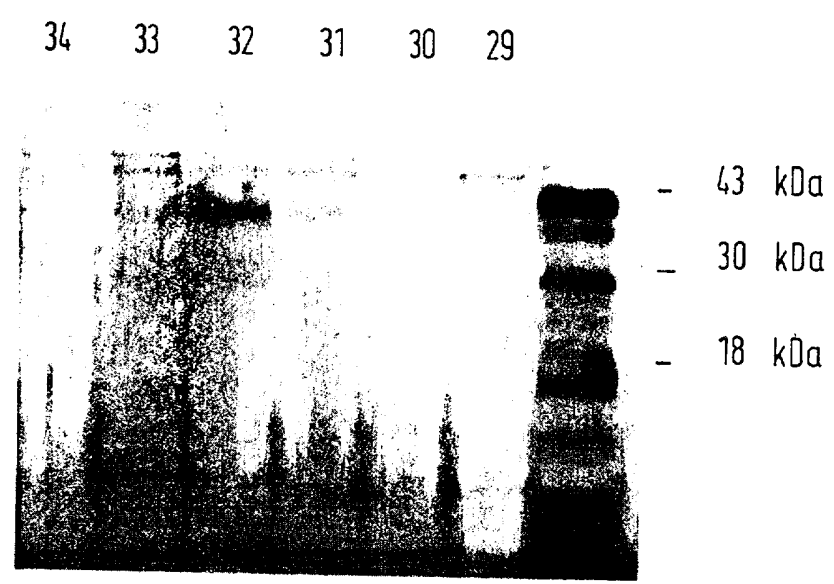


FIG. 30

- 66 -

23.10.90

U937-derived TNF inhibitor1 (30 kDa)

()-()-Val-()-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-()-Asn-()-Ile-

U937-derived TNF inhibitor2 (40 kDa)

Leu-Pro-Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-Arg-

Leu-Arg-Glu-Tyr-Tyr-Asp-Gln-Thr-Ala-Gln-Met-Cys-Cys-Ser-Lys-Cys-

Urine-derived TNF inhibitor2 (40 kDa)

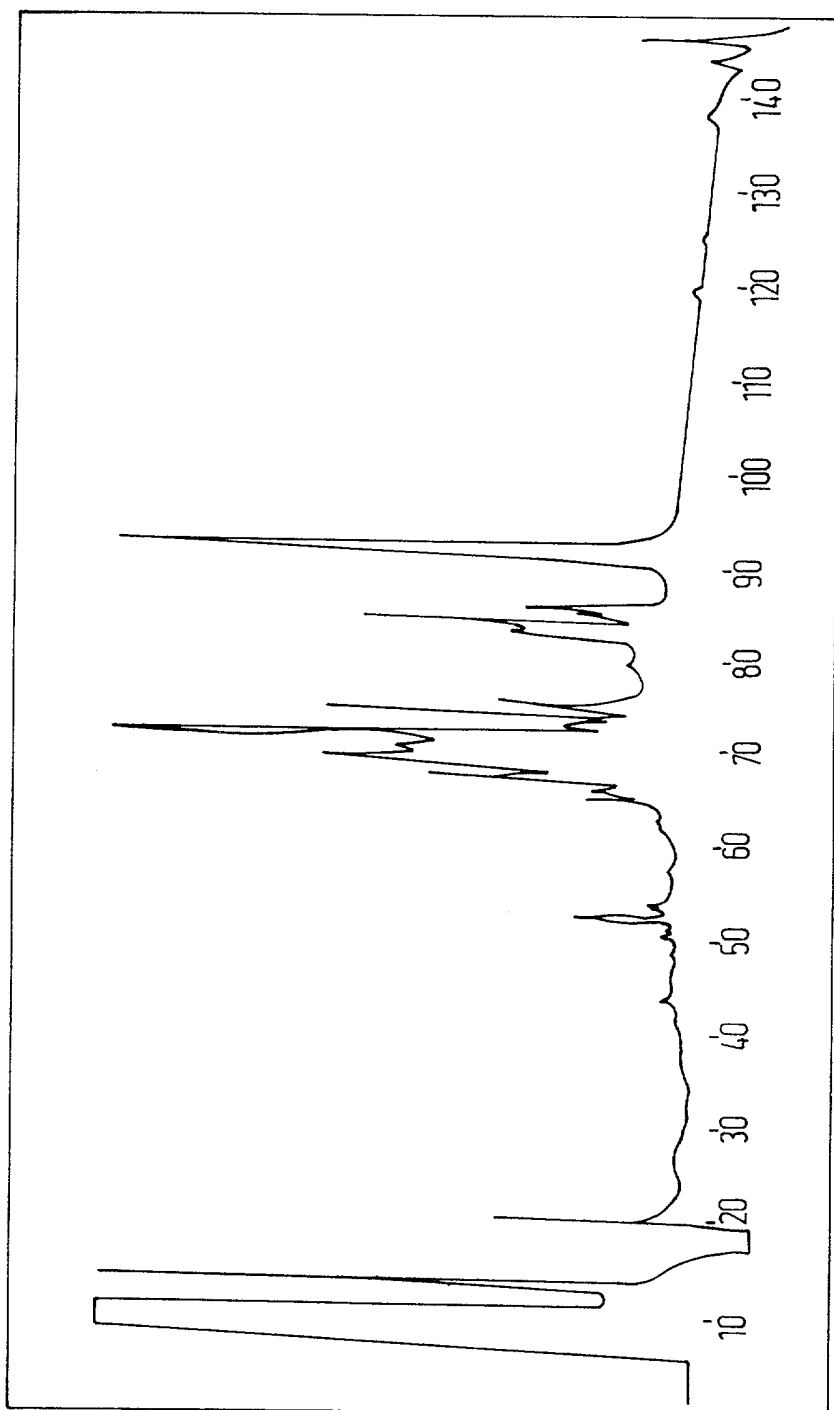
Ala-Gln-Val-Ala-Phe-Thr-Pro-Tyr-Ala-Pro-Glu-Pro-Gly-Ser-Thr-Cys-()-Leu-()-

Glu-

FIG. 31

23-10-80

- 67 -



V8 Digest

FIG. 32

27-10-90

- 68 -

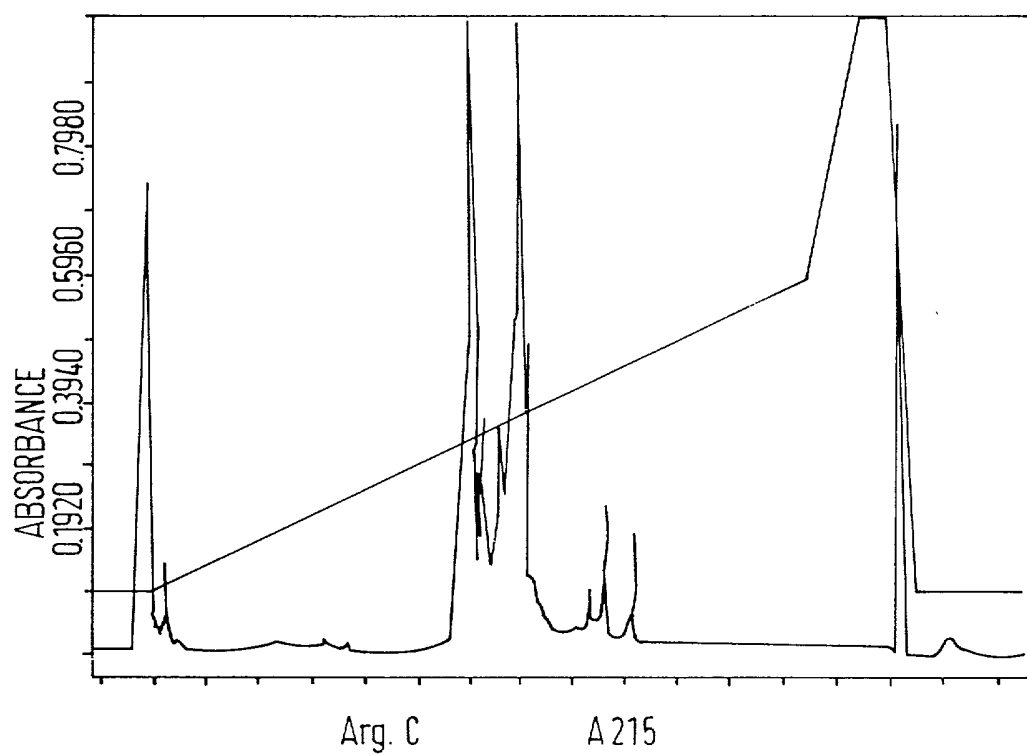


FIG. 33

201010

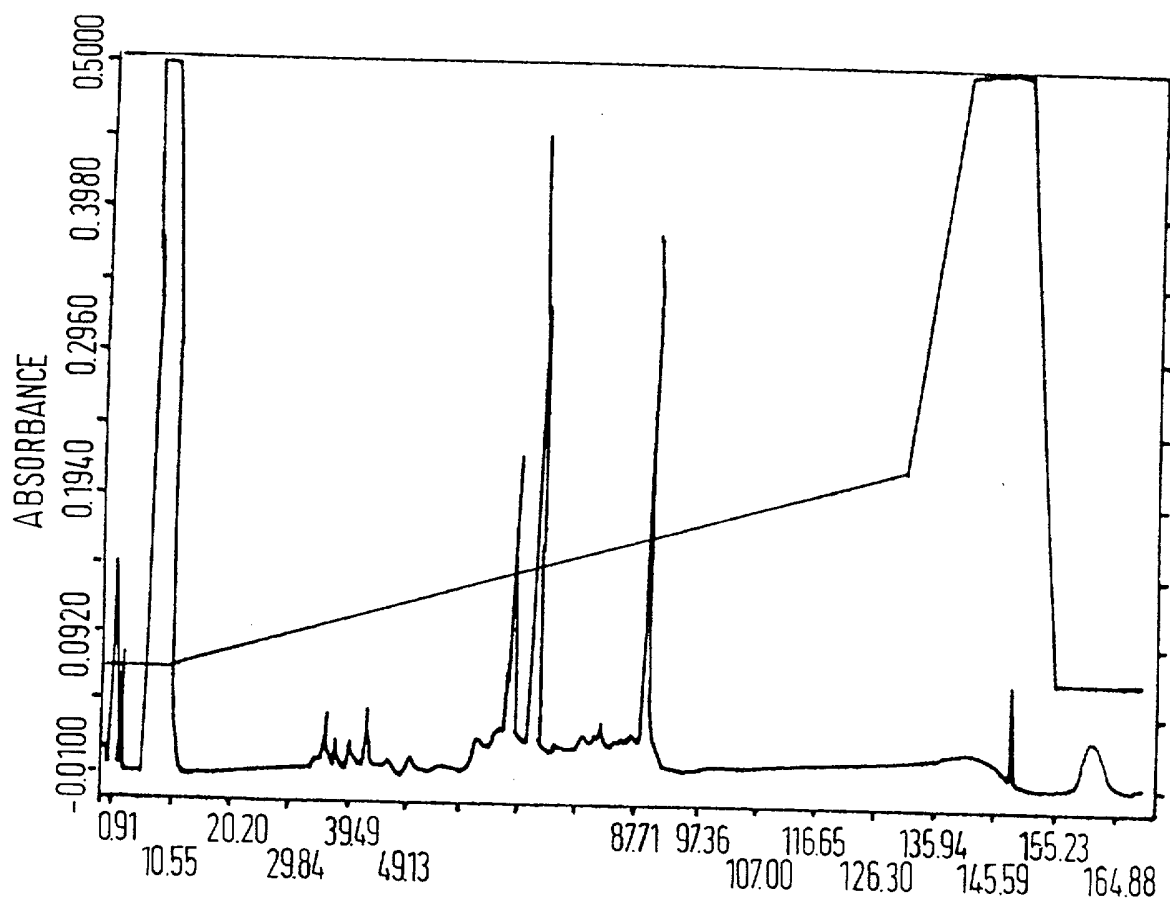


FIG. 34

23-10-90

-70-

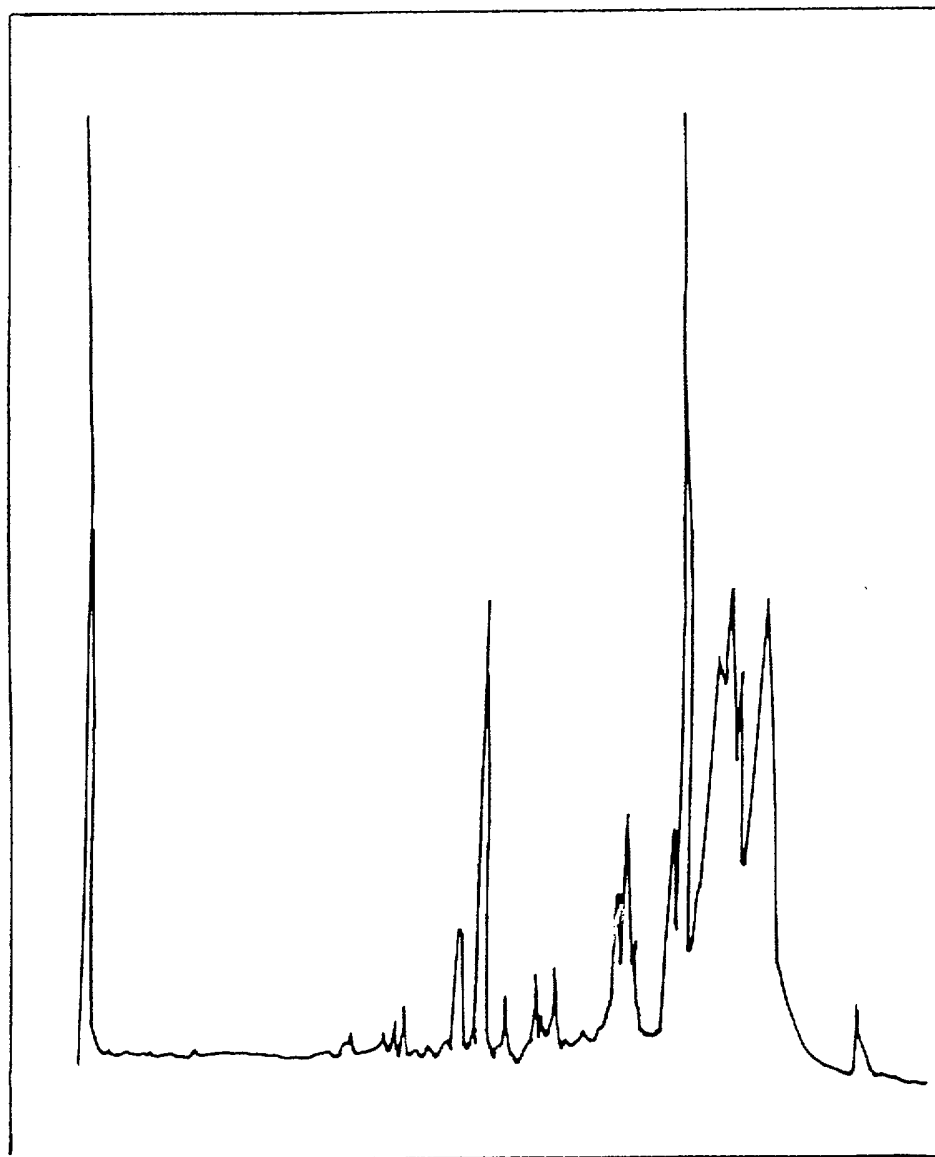


FIG. 35

- 71 -

1 10 20 30 40 50 60 70 80
 LPAQVAFTPYAPEPGSTCRRLREYVDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDSTYTL_N_VPECLSCGSRCSDDQVE_
 NT
 V25
 R12
 V34,35
 R16
 V37
 V6
 R4
 R16 T 30
 R16 T 30 V9
 R16 T 30 V4

90 100 110 120 130 140 150
 -ACTREQNR ICTCRPGWYCALSKQEGCRLCAPLRKCRPGFGVARPGTETSDVVCKPCAPGTFS_TTSS(T)(DNPICRVP)
 R4
 V23
 R14
 V20
 R10
 R16 T 13
 R10 C19
 R10 C32
 R10 C17
 R10

FIG. 36

- 72 -

5'-CCG
Pro

58	64	73	62	91	100												
GAG	CCC	GGG	AGC	ACA	TGC	CGG	CTC	AGA	GAA	TAC	TAT	GAC	CAG	ACA	GCT	CAG	ATG
Glu	Pro	Gly	Ser	Thr	Cys	Arg	Leu	Arg	Glu	Tyr	Tyr	Asp	Gln	Thr	Ala	Gln	MET
109		118		127		136		145		154							
TGC	TGC	AGC	AAG	TGC	TCG	CCG	GGC	CAA	CAT	GCA	AAA	GTC	TTC	TGT	ACC	AAG	ACC
Cys	Cys	Ser	Lys	Cys	Ser	Pro	Gly	Gln	His	Ala	Lys	Val	Phe	Cys	Thr	Lys	Thr
163		172		181		190		199		208							
TCG	GAC	ACC	GTG	TGT	GAC	TCC	TGT	GAG	GAC	AGC	ACA	TAC	ACC	CAG	CTC	TGG	AAC
Ser	Asp	Thr	Val	Cys	Asp	Ser	Cys	Glu	Asp	Ser	Thr	Tyr	Thr	Gln	Leu	Trp	Asn
217		226		235		244		253		262							
TGG	GTT	CCC	GAG	TGC	TTG	AGC	TGT	GGC	TCC	CGC	TGT	AGC	TCT	GAC	CAG	GTG	GAA
Trp	Val	Pro	Glu	Cys	Leu	Ser	Cys	Gly	Ser	Arg	Cys	Ser	Ser	Asp	Gln	Val	Glu
217		280		289		298		307		316							
ACT	CAA	GCC	TGC	ACT	CGG	GAA	CAG	AAC	CGC	ATC	TGC	ACC	TGC	AGG	CCC	GGC	TGG
Thr	Gln	Ala	Cys	Thr	Arg	Glu	Gln	Asn	Arg	Ile	Cys	Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp
325																	

TAC TGC-3'
Tyr Cys

FIG. 37

12.10.90

Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser
Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys
Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr
Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr Thr Gln Leu
Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser Ser
Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys
Thr Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys
Arg Leu Cys Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala
Arg Pro Gly Thr Glu Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro
Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His
Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro Gly Asn Ala Ser Arg Asp Ala
Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser Met Ala Pro Gly Ala Val
His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr Gln Pro Thr
Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro Met Gly
Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp

FIG. 38

- 74 -

10 20 30 40 50 60 70
 GAATTCGGCG CAGCGGAGCC TGGAGAGAAG GCGCTGGGCT GCGAGGGCGC GAGGGCGCGA GGGCAGGGGG

80	90	101	110	119
CAACCGGACC	CCGCCCCGAC	CC	ATG GCG CCC GTC GCC GTG TGG GCC GCG CTG GCC	
			MET Ala Pro Val Ala Val Trp Ala Ala Leu Ala	
128	137	146	155	164
GTC GGA CTG GAG CTC TGG GCT GCG GCG CAC GCC TTG CCC GCC CAG GTG GCA TTT				
Val Gly Leu Glu Leu Trp Ala Ala Ala His Ala Leu Pro Ala Gln Val Ala Phe				
182	191	200	209	218
ACA CCC TAC GCC CCG GAG CCC GGG AGC ACA TGC CCG CTC AGA GAA TAC TAT GAC				
Thr Pro Tyr Ala Pro Glu Pro Gly Ser Thr Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp				
236	245	254	263	272
CAG ACA GCT CAG ATG TGC TGC AGC AAG TGC TCG CCG GGC CAA CAT GCA AAA GTC				
Gln Thr Ala Gln MET Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val				
290	299	308	317	326
TTC TGT ACC AAG ACC TCG GAC ACC GTG TGT GAC TCC TGT GAG GAC AGC ACA TAC				
Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys Asp Ser Cys Glu Asp Ser Thr Tyr				
344	353	362	371	380
ACC CAG CTC TGG AAC TGG GTT CCC GAG TGC TTG AGC TGT GGC TCC CGC TGT AGC				
Thr Gln Leu Trp Asn Trp Val Pro Glu Cys Leu Ser Cys Gly Ser Arg Cys Ser				
398	407	416	425	434
TCT GAC CAG GTG GAA ACT CAA GCC TGC ACT CCG GAA CAG AAC CGC ATC TGC ACC				
Ser Asp Gln Val Glu Thr Gln Ala Cys Thr Arg Glu Gln Asn Arg Ile Cys Thr				
452	461	470	479	488
TGC AGG CCC GGC TGG TAC TGC GCG CTG AGC AAG CAG GAG GGG TGC CGG CTG TGC				
Cys Arg Pro Gly Trp Tyr Cys Ala Leu Ser Lys Gln Glu Gly Cys Arg Leu Cys				
506	515	524	533	542
GCG CCG CTG CCG AAG TGC CCG CCG GGC TTC GGC GTG GCC AGA CCA GGA ACT GAA				
Ala Pro Leu Arg Lys Cys Arg Pro Gly Phe Gly Val Ala Arg Pro Gly Thr Glu				
560	569	578	587	596
ACA TCA GAC GTG GTG TGC AAG CCC TGT GCC CCG GGG ACG TTC TCC AAC ACG ACT				
Thr Ser Asp Val Val Cys Lys Pro Cys Ala Pro Gly Thr Phe Ser Asn Thr Thr				
614	623	632	641	650
TCA TCC ACG GAT ATT TGC AGG CCC CAC CAG ATC TGT AAC GTG GTG GCC ATC CCT				
Ser Ser Thr Asp Ile Cys Arg Pro His Gln Ile Cys Asn Val Val Ala Ile Pro				
668	677	686	695	704
GGG AAT GCA AGC AGG GAT GCA GTC TGC ACG TCC ACG TCC CCC ACC CGG AGT ATG				
Gly Asn Ala Ser Arg Asp Ala Val Cys Thr Ser Thr Ser Pro Thr Arg Ser MET				
722	731	740	749	758
GCC CCA GGG GCA GTA CAC TTA CCC CAG CCA GTG TCC ACA CGA TCC CAA CAC ACG				
Ala Pro Gly Ala Val His Leu Pro Gln Pro Val Ser Thr Arg Ser Gln His Thr				
776	785	794	803	812
CAG CCA ACT CCA GAA CCC AGC ACT GCT CCA AGC ACC TCC TTC CTG CTC CCA ATG				
Gln Pro Thr Pro Glu Pro Ser Thr Ala Pro Ser Thr Ser Phe Leu Leu Pro MET				
830	839	848	857	866
GGC CCC AGC CCC CCA GCT GAA GGG AGC ACT GGC GAC TTC GCT CTT CCA GTT GGA				
Gly Pro Ser Pro Pro Ala Glu Gly Ser Thr Gly Asp Phe Ala Leu Pro Val Gly				

FIG. 39

- 75 -

20 10 90

884	893	902	911	920	929
CTG ATT GTG GGT GTG ACA GCC TTG GGT CTA CTA ATA ATA GGA GTG GTG AAC TGT					
Leu Ile Val Gly Val Thr Ala Leu Gly Leu Leu Ile Ile Gly Val Val Asn Cys					
938	947	956	965	974	983
GTC ATC ATG ACC CAG GTG AAA AAG AAG CCC TTG TGC CTG CAG AGA GAA GCC AAG					
Val Ile MET Thr Gln Val Lys Lys Lys Pro Leu Cys Leu Gln Arg Glu Ala Lys					
992	1001	1010	1019	1028	1037
GTG CCT CAC TTG CCT GCC GAT AAG GCC CGG GGT ACA CAG GGC CCC GAG CAG CAG					
Val Pro His Leu Pro Ala Asp Lys Ala Arg Gly Thr Gln Gly Pro Glu Gln Gln					
1046	1055	1064	1073	1082	1091
CAC CTG CTG ATC ACA GCG CCG AGC TCC AGC AGC AGC TCC CTG GAG AGC TCG GCC					
His Leu Leu Ile Thr Ala Pro Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Glu Ser Ser Ala					
1100	1109	1118	1127	1136	1145
AGT GCG TTG GAC AGA AGG GCG CCC ACT CGG AAC CAG CCA CAG GCA CCA GGC GTG					
Ser Ala Leu Asp Arg Arg Ala Pro Thr Arg Asn Gln Pro Gln Ala Pro Gly Val					
1154	1163	1172	1181	1190	1199
GAG GCC AGT GGG GCC GGG GAG GCC CGG GCC AGC ACC GGG AGC TCA GAT TCT TCC					
Glu Ala Ser Gly Ala Gly Glu Ala Arg Ala Ser Thr Gly Ser Ser Asp Ser Ser					
1208	1217	1226	1235	1244	1253
CCT GGT GGC CAT GGG ACC CAG GTC AAT GTC ACC TGC ATC GTG AAC GTC TGT AGC					
Pro Gly Gly His Gly Thr Gln Val Asn Val Thr Cys Ile Val Asn Val Cys Ser					
1262	1271	1280	1289	1298	1307
AGC TCT GAC CAC AGC TCA CAG TGC TCC TCC CAA GCC AGC TCC ACA ATG GGA GAC					
Ser Ser Asp His Ser Ser Gln Cys Ser Ser Gln Ala Ser Ser Thr MET Gly Asp					
1316	1325	1334	1343	1352	1361
ACA GAT TCC AGC CCC TCG GAG TCC CCG AAG GAC GAG CAG GTC CCC TTC TCC AAG					
Thr Asp Ser Ser Pro Ser Glu Ser Pro Lys Asp Glu Gln Val Pro Phe Ser Lys					
1370	1379	1388	1397	1406	1415
GAG GAA TGT GCC TTT CCG TCA CAG CTG GAG ACG CCA GAG ACC CTG CTG GGG AGC					
Glu Glu Cys Ala Phe Arg Ser Gln Leu Glu Thr Pro Glu Thr Leu Leu Gly Ser					
1424	1433	1442	1451	1460	1469
ACC GAA GAG AAG CCC CTG CCC CTT GGA GTG CCT GAT GCT GGG ATG AAG CCC AGT					
Thr Glu Glu Lys Pro Leu Pro Leu Gly Val Pro Asp Ala Gly MET Lys Pro Ser					

FIG. 39 continued

- 76 -

1478	1488	1498	1508	1518	1528	1538
TAA CCAGGCCGGT GTGGGCTGTG TCGTAGCCAA GGTGGGCTGA GCCCTGGCAG GATGACCCTG						
1548	1558	1568	1578	1588	1598	1608
CGAAGGGGCC	CTGGTCCTTC	CAGGCCCCCA	CCACTAGGAC	TCTGAGGCTC	TTTCTGGGCC	AAGTTCCTCT
1618	1628	1638	1648	1658	1668	1678
AGTGCCCTCC	ACAGCCGCAG	CCTCCCTCTG	ACCTGCAGGC	CAAGAGCAGA	GGCAGCGGGT	TGTGGAAAGC
1688	1698	1708	1718	1728	1738	1748
cTGTGCTGCC	ATGGTGTGTC	CCTCTCGGAA	GGCTGGCTGG	GCATGGACGT	TCGGGGCATG	CTGGGGCAAG
1758	1768	1778	1788	1898	1808	1818
TCCCTGACTC	TCTGTGACCT	GCCCCGCCCA	GCTGCACCTG	CCAGCCTGGC	TTCTGGAGCC	CTTGGGTTTT
1828	1838	1848	1858	1868	1878	1888
TTGTTTGTTT	GTTTGTTTGT	TTGTTTGTTT	CTCCCCCTGG	GCTCTGCCCC	AGCTCTGGCT	TCCAGAAAAC
1898	1908	1918	1928	1938	1948	1958
CCCAGCATCC	TTTTCTGCAG	AGGGGCTTTC	TGGAGAGGAG	GGATGCTGCC	TGAGTCACCC	ATGAAGACAG
1968	1978	1988	1998	2008	2018	2028
GACAGTGCTT	CAGCCTGAGG	CTGAGACTGC	GGGATGGTCC	TGGGGCTCTG	TGCAGGGAGG	AGGTGGCAGC
2038	2048	2058	2068	2078	2088	2098
CCTGTAGGGA	ACGGGGTCCT	TCAAGTTAGC	TCAGGAGGCT	TGGAAAGCAT	CACCTCAGGC	CACTGTGCCC
2108	2118	2128	2138	2148	2158	2168
ACCCCGATTT	AAACTCTTTA	TCTCCCAAAT	GGGAATATAA	GAACCTGTCC	TTTCTATCAC	AAAGGGAGAT
2178	2188	2198	2208	2218		
TGTGAGCAAG	AGGGCAATTA	ATAATAATGG	CCAAATAATT	AAAAAACCT	AATTC	

FIG. 39 CONT.

25.10.90

- 77 -

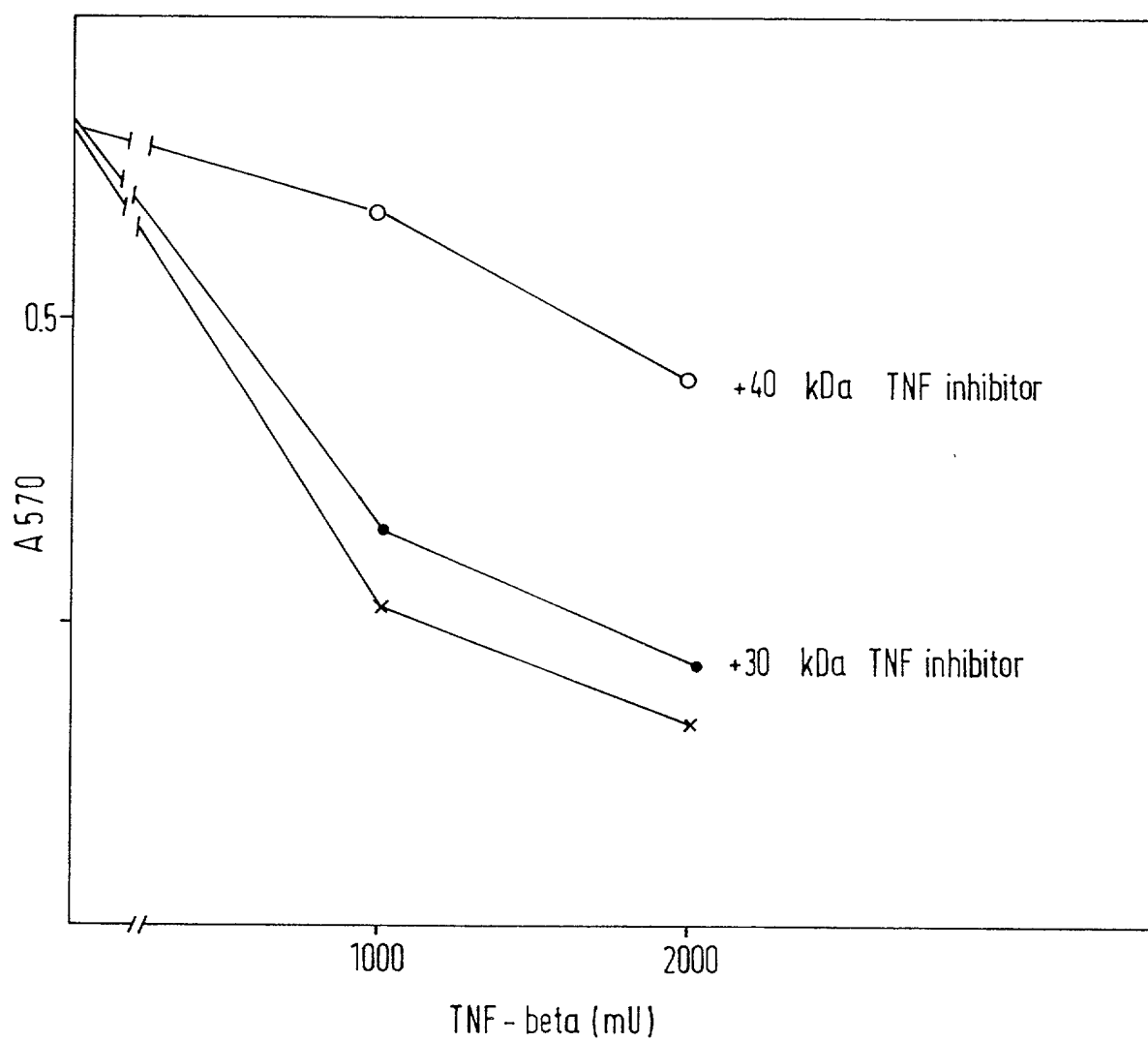


FIG. 40

25-10-90

- 78 -

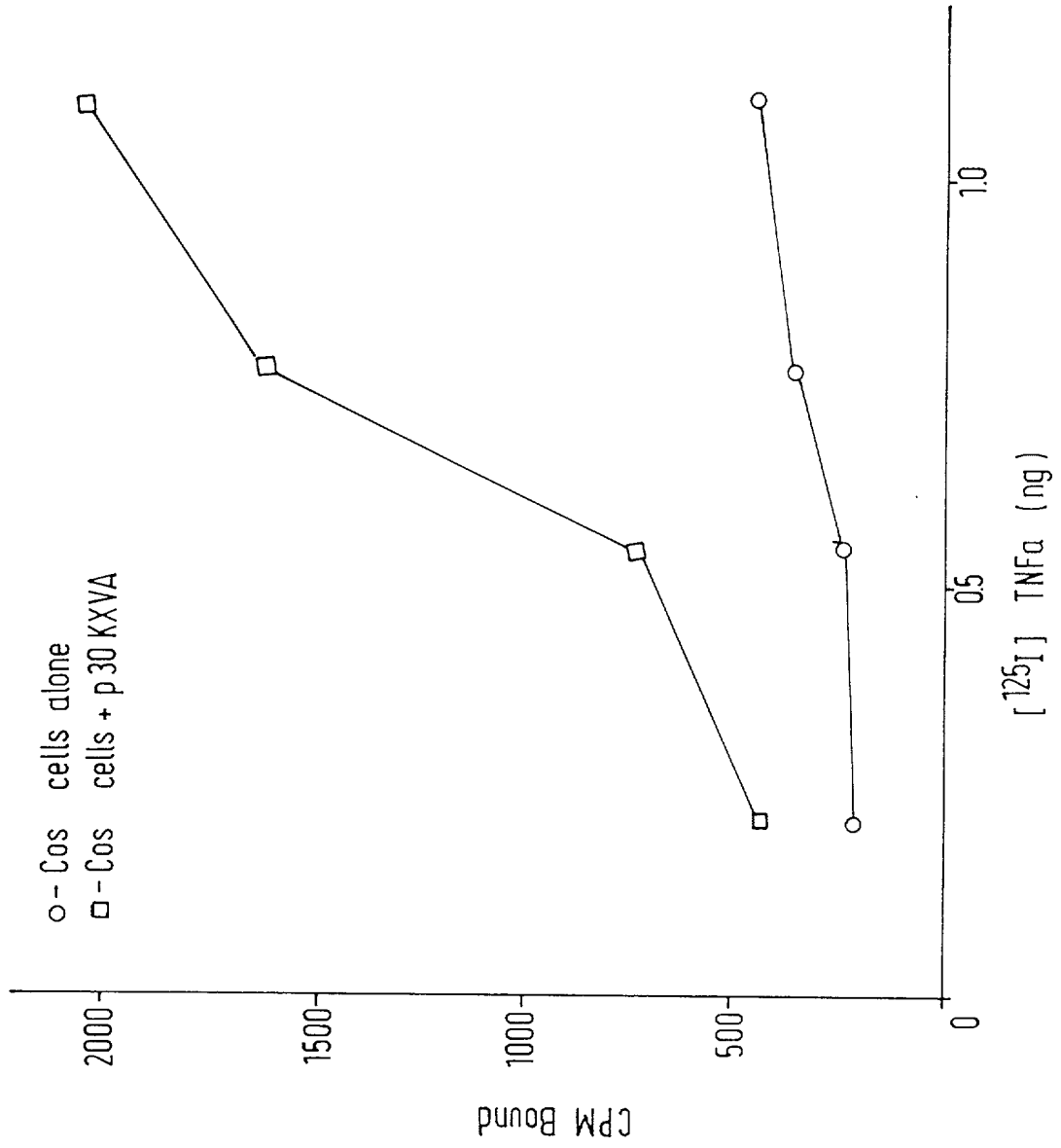


FIG. 41

2000000

- 79 -

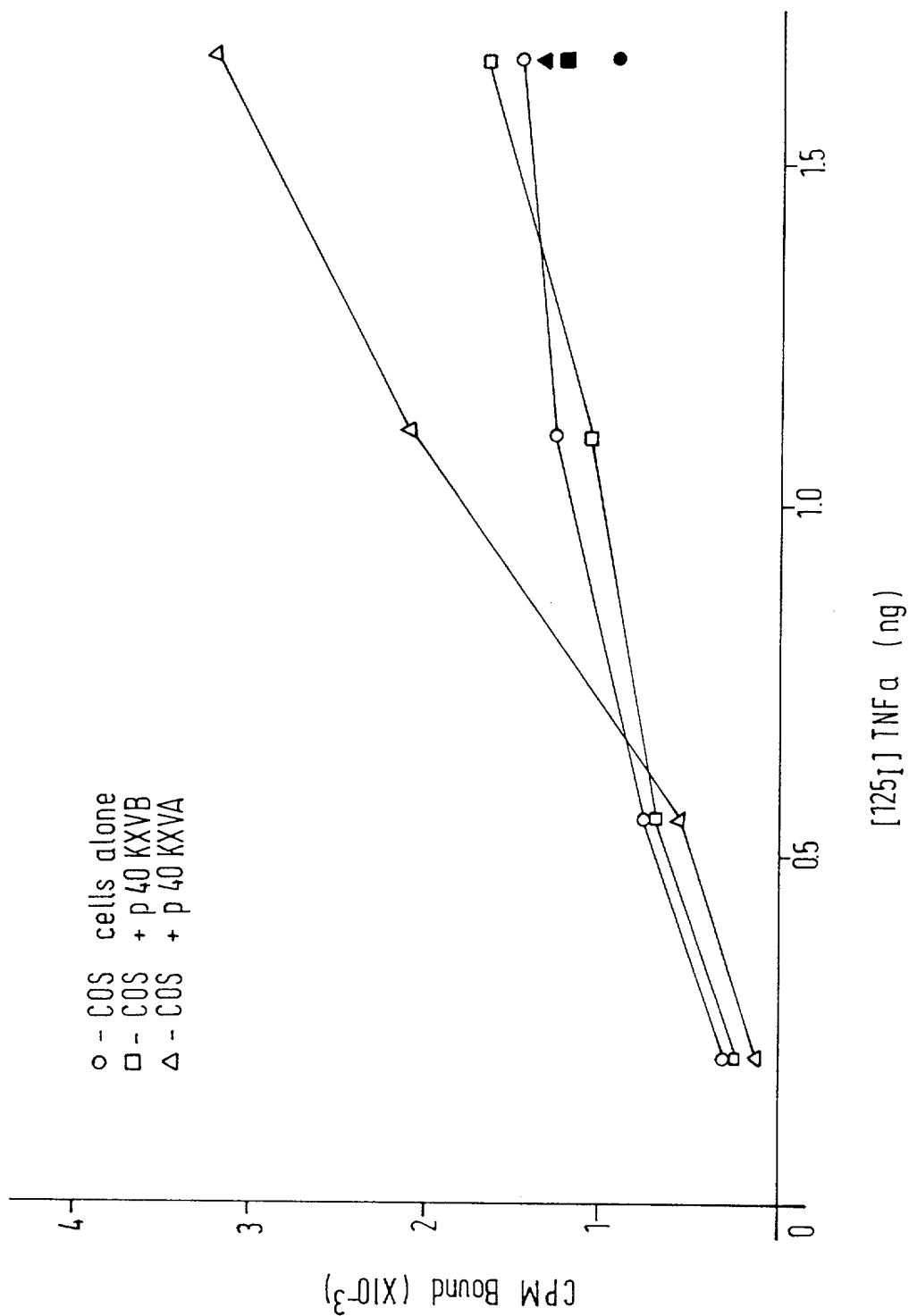


FIG. 42

- 80 -

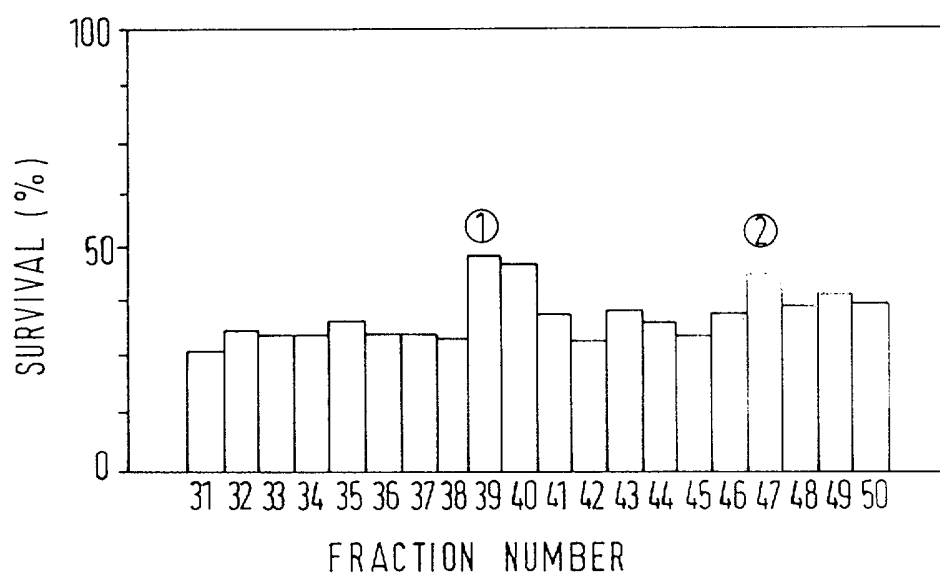


FIG. 43

- 81 -

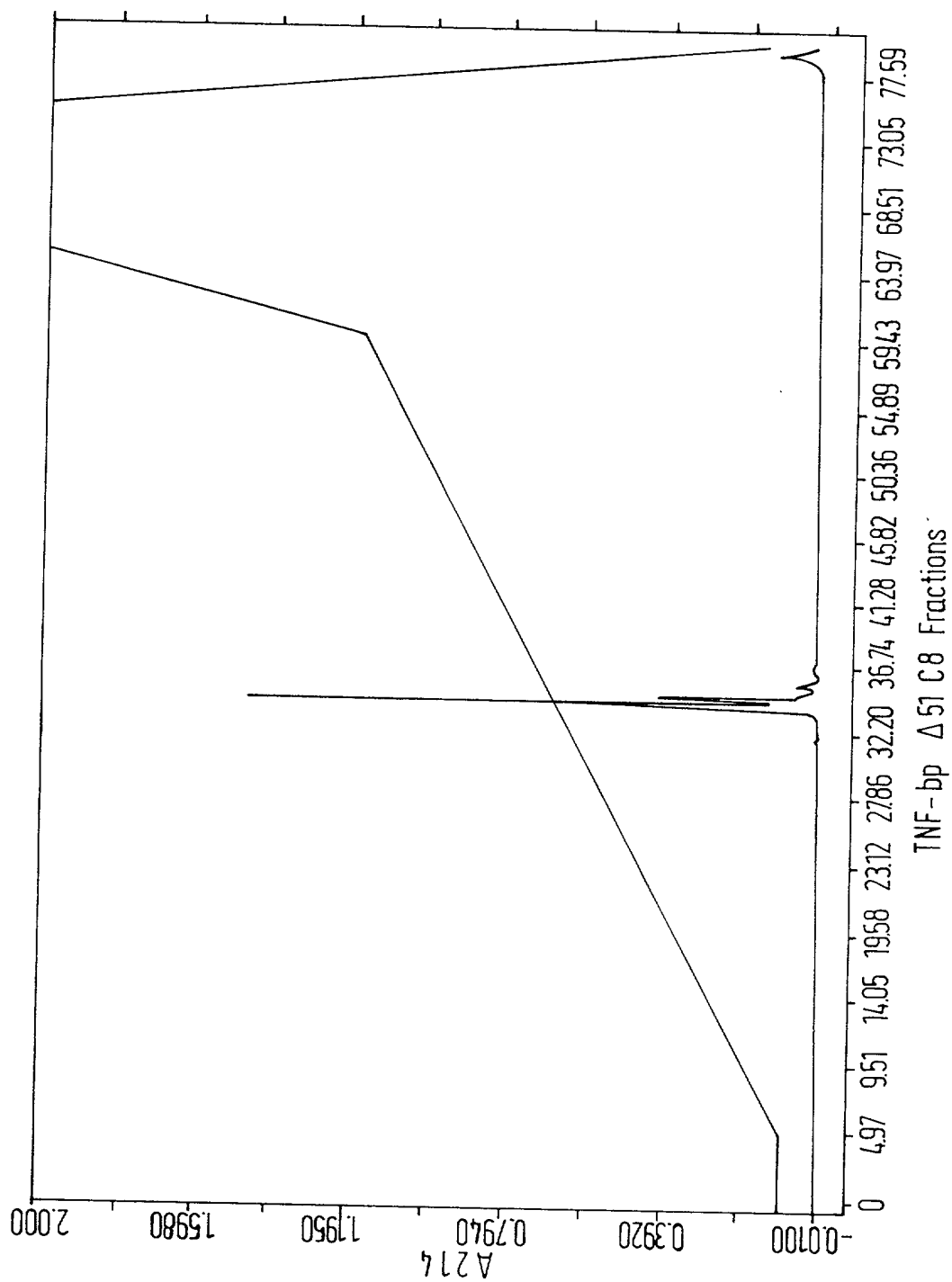


FIG. 44A

- 82 -

32 33 34 35 36 37 38 39 40 - TNF^{γ} LMW

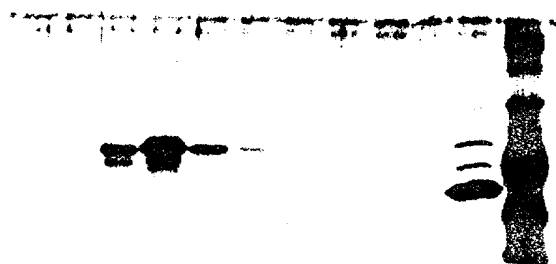
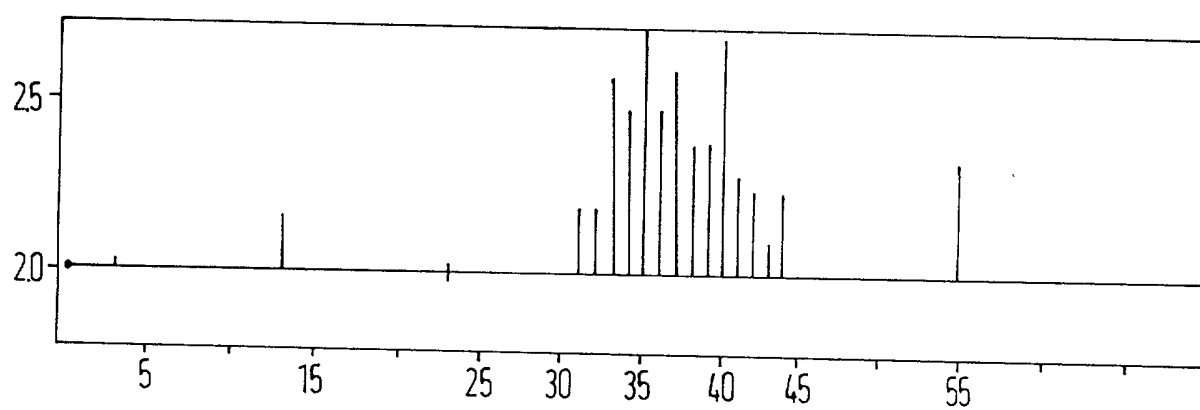


FIG. 44B

25-10-91

- 83 -



C8 FRACTIONS

FIG. 44C

- 84 -

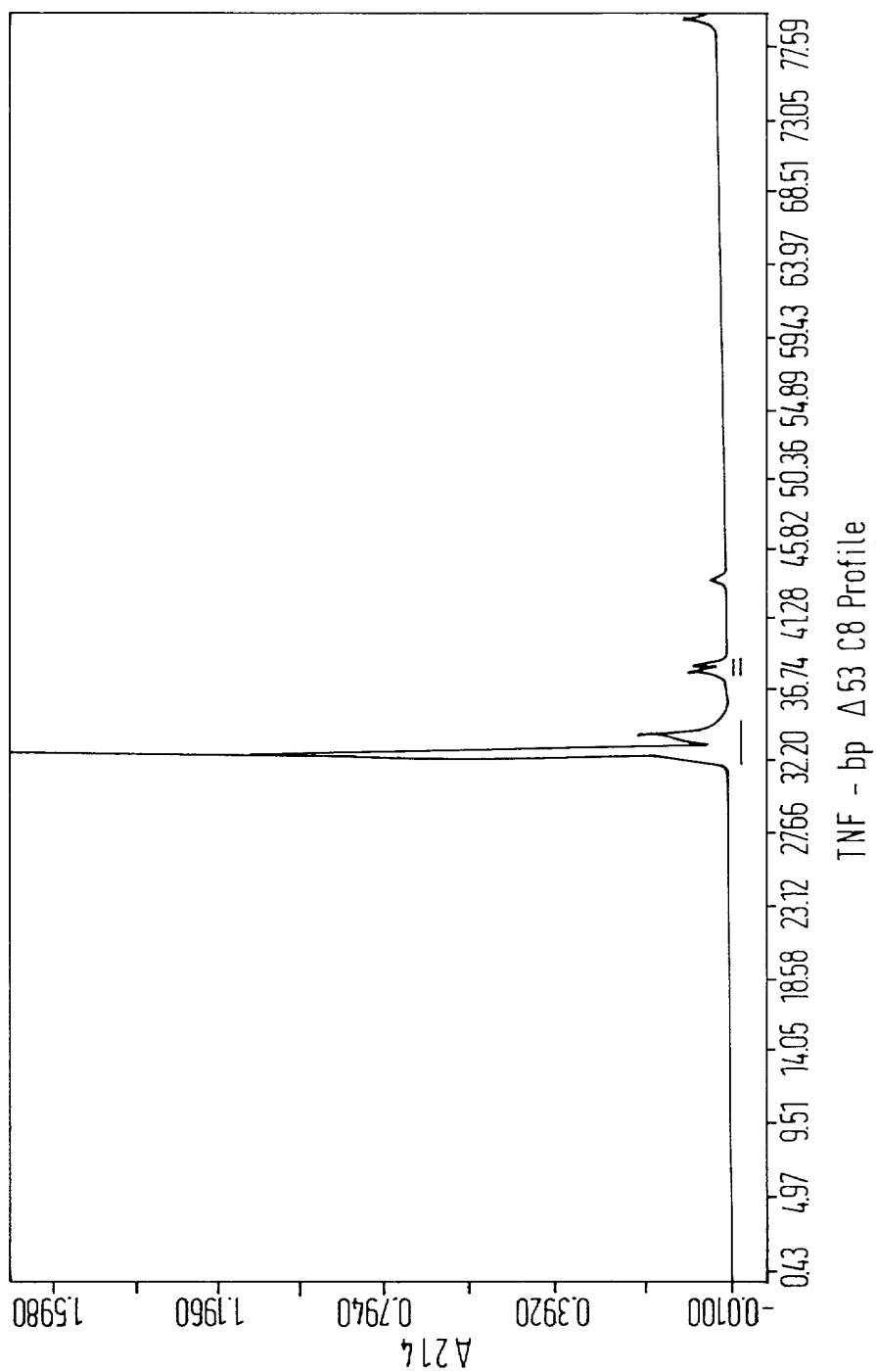


FIG. 45A

- 85 -

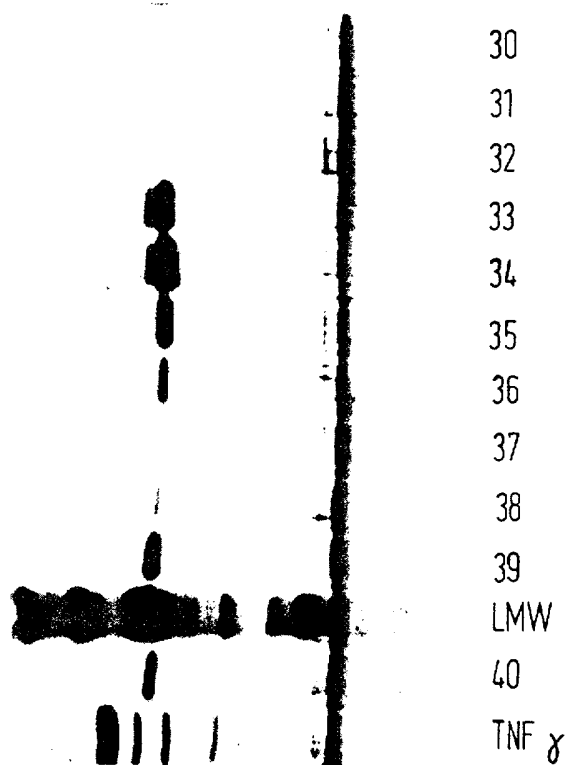


FIG. 45 B

- 86 -

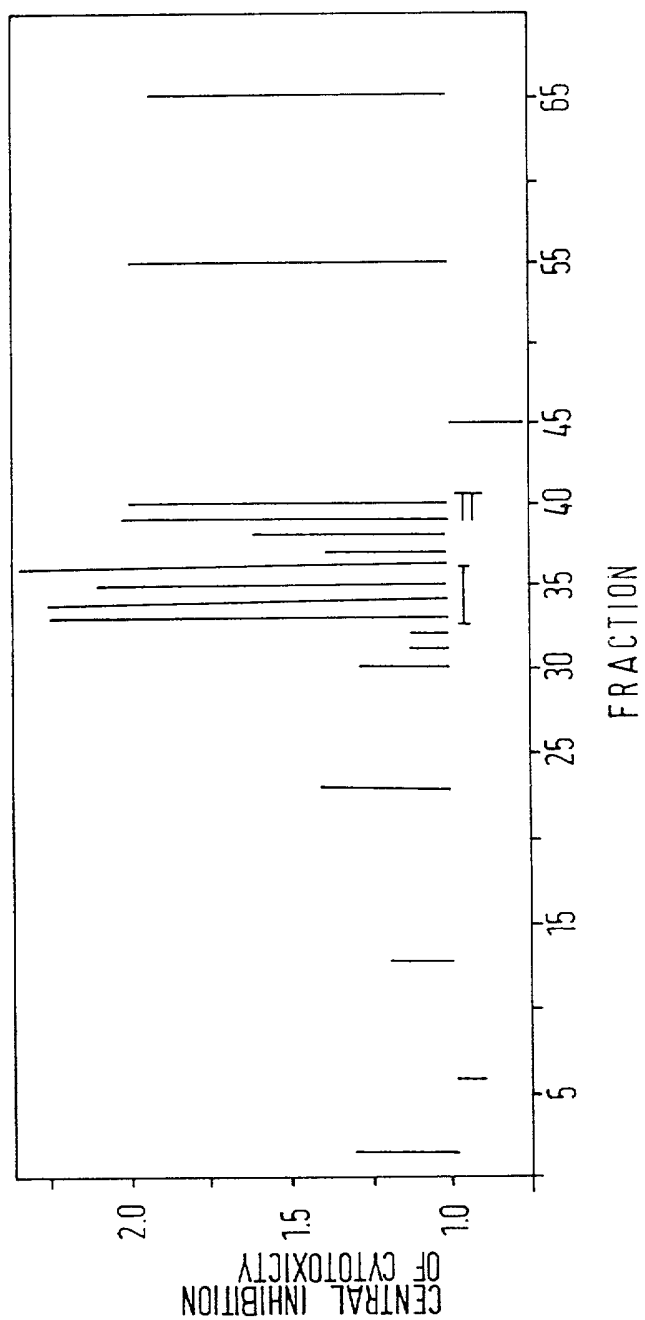


FIG. 45C