



(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 240 216 A5

 4(51) C 12 N 15/00
 C 12 P 21/00
 C 07 K 3/20

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

 (21) AP C 12 N / 283 097 8
 (31) 59-246184

 (22) 21.11.85
 (32) 22.11.84

 (44) 22.10.86
 (33) JP

 (71) siehe (73)
 (72) Kajihara, Junichi; Kiyota, Takao; Hayashi, Hiroshi, JP
 (73) Asahi Kasei Kogyo Kabushiki Kaisha, Osaka, JP

(54) Verfahren zur Reinigung einer physiologisch aktiven Substanz hergestellt durch Rekombination von technischen DNA

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung einer durch Rekombinant-DNA-Technik erzeugten physiologisch aktiven Substanz. Mit der Erfindung wird ein Verfahren zur Verfügung gestellt, mit dem Human-TNF gewonnen wird, welches eine ausgezeichnete Antitumor-Wirkung besitzt und vom Menschen stammt. Die Aufgabe der Erfindung besteht in der Schaffung eines Verfahrens zur Reinigung von durch Rekombinant-DNA-Technik erzeugter Human-TNF. Eine wäßrige Lösung, die eine physiologisch aktive Substanz enthält, die durch Rekombinant-DNA-Technik erzeugt wird und die zytotoxische Aktivität gegenüber L-M-Zellen besitzt und in der Lage ist, hämorrhagische Necrose von transplantiertem Meth A Sarcom in der BALB/c-Maus zu induzieren, kann tatsächlich wirksam durch Säulenchromatographie unter Einsatz einer mit einem Farbstoff gebundenen vernetzten Agarosegel gefüllten Säule gereinigt werden.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Reinigung einer physiologisch aktiven Substanz, **gekennzeichnet dadurch**, daß eine wäßrige Lösung, die eine physiologisch aktive Substanz in roher Form enthält, der Säulenchromatographie unter Verwendung einer mit einem farbstoffgebundenen vernetzten Agarosegel gefüllten Säule unterzogen wird, wobei das farbstoffgebundene vernetzte Agarosegel aus einem vernetzten Agarosegel als Träger und einem kovalent daran gebundenen Farbstoff als Liganden besteht.
Wobei es sich bei der physiologisch aktiven Substanz um eine handelt, die durch Rekombinant-DNA-Technik unter Verwendung einer Rekombinant-DNA hergestellt wird, die eine für die physiologisch aktive Substanz kodierende DNA enthält und die zytotoxische Aktivität gegenüber L-M-Zellen aufweist und in der Lage ist, hämorrhagische Necrose von transplantiertem Meth A Sarcom bei der BALB/c-Maus zu induzieren.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß es sich bei der physiologisch aktiven Substanz um ein Polypeptid mit einer durch die folgende Formel (I) dargestellten Aminosäuresequenz handelt:
Ser Ser Ser Arg Thr Pro Ser Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu
worin Gln für einen Glutaminrest steht, Asp für einen Asparaginsäurerest, Pro einen Prolinrest, Tyr einen Tyrosinrest, Val einen Valinrest, Lys einen Lysinrest, Glu einen Glutaminsäurerest, Ala einen Alaninrest, Asn einen Asparaginrest, Leu einen Leucinrest, Phe einen Phenylalaninrest, Gly einen Glycinrest, His einen Histidinrest, Ser einen Serinrest, Thr einen Threoninrest, Ile einen Isoleucinrest, Trp einen Tryptophanrest, Arg einen Argininrest, Met einen Methioninrest und Cys einen Cysteinrest.
3. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die für die physiologisch aktive Substanz kodierende DNA mindestens eine Basensequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die eine durch die folgende Formel (II) dargestellte Basensequenz und eine zu der Basensequenz komplementäre Basensequenz umfaßt:
TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA CAT AAC CAG CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTG
worin A für einen Desoxyadenylsäurerest steht, G einen Desoxyguanylsäurerest, C einen Desoxycytidylsäurerest und T einen Thymidylsäurerest, und worin das linke Ende und das rechte Ende von Formel (II) die 5'-Hydroxylgruppenseite bzw. die 3'-Hydroxylgruppenseite darstellen.
4. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß es sich bei dem Farbstoff um ein Glied aus der Gruppe handelt, die Cebacron Blue F3GA (Farbindexname: Reaktivfarbstoff Blau 2), Procion Red HE3B (Farbindexname: Reaktivfarbstoff Rot 120) und Green A (zu beziehen von Amicon Corporation, USA in Form eines Green-A-gebundenen vernetzten Agarosegels unter dem Warenzeichen „Matrex Gel Green A“) umfaßt.

Hierzu 7 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Reinigung einer durch Rekombinant-DNA-Technik erzeugten physiologisch aktiven Substanz, die in der Medizin anwendbar ist, und genauer ein Verfahren für die Reinigung einer physiologisch aktiven Substanz, bei dem eine wäßrige Lösung, die eine rohe physiologisch aktive Substanz enthält, welche aus einem künstlich erzeugten Bakterium oder Hefe mit Hilfe der Rekombinant-DNA-Technik erzeugt wurde und eine Antitumor-Aktivität besitzt, der Säulenchromatographie unter Einsatz einer mit einem farbstoffgebundenen vernetzten Agarosegel gefüllten Säule unterzogen wird.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Bekannt ist, daß es eine physiologisch aktive Substanz gibt, die vom Menschen stammt und die eine zytotoxische Aktivität in bezug auf L-M-Zellen besitzt und in der Lage ist, hämorrhagische Necrose eines transplantierten Tumors, Meth A Sarcom, in der BALB/c Maus zu induzieren. Eine solche physiologisch aktive Substanz besitzt eine Antitumor-Aktivität und wird Human Tumor Necrosis Factor genannt (anschließend häufig als „Human TNF“ bezeichnet). Ebenfalls bekannt ist, daß ein solcher Human TNF keine toxische Wirkung auf normale Zellen in vitro ausübt. Außerdem besteht, da der Human-TNF vom Menschen stammt, keine Gefahr, daß ein anaphylaktischer Schock durch die Verabreichung einer Substanz an einen Menschen, von dem die Substanz nicht stammt, hervorgerufen wird. Daher sind die Erwartungen für die klinische Anwendung des oben genannten Human TNF als Antitumor-Medizin im Fachgebiet hoch gewesen.

Um die breite und sichere klinische Anwendung von Human-TNF als Antitumor-Medizin zu gewährleisten, muß Human-TNF in einer stark gereinigten Form in großen Mengen gewonnen werden können. Kürzlich wurde ein Verfahren zur Gewinnung von Human-TNF mit Hilfe der Rekombinant-DNA-Technik vorgeschlagen. Die vorgeschlagene Methode besteht in:

Ligation einer Desoxyribonucleinsäure, die für Human-TNF kodiert auf ein reproduzierbares Expressions-Vehikel, zur Gewinnung einer reproduzierbaren Rekombinant DNA, die aus der Desoxyribonucleinsäure und dem reproduzierbaren Expressions-Vehikel besteht;

Transformation von Zellen eines Mikroorganismus oder einer Zellkultur mit der reproduzierbaren Rekombinant-DNA zur Bildung von Transformanten;

Selektion der Transformanten von Elternzellen des Mikroorganismus oder der Zellkultur;

Inkubation der Transformanten, damit diese Transformanten zur Expression der Desoxyribonucleinsäure und zur Erzeugung von Human TNF gezwungen werden; und

Isolierung von Human-TNF von den inkubierten Transformanten und anschließende Reinigung.

Die Reinigung von Human-TNF wird gewöhnlich unter Anwendung einer Kombination von verschiedenen bekannten Techniken, wie Ultrafiltration, Dialyse, Ionenaustausch, Affinitäts-Chromatographie, Gelfiltration und Elektrophorese ausgeführt.

Hinsichtlich der Affinitäts-Chromatographie, die als herkömmliches Verfahren angewandt wird, wird in der offengelegten japanischen Patentanmeldungs-Spezifikation Nr. 58-138383 (1983) dargelegt, daß es sich für eine wirksame Reinigung einer Substanz mit Antitumor-Aktivität, die von der Kultur von Säugetierzellen oder verschmolzenen Zellen davon gewonnen wurde, vorteilhaft erweisen kann, eine Technik der Affinitäts-Chromatographie anzuwenden, bei der ein bestimmter Antikörper gegen die Substanz mit der Antitumor-Aktivität als Adsorptionsmittel eingesetzt wird. Eine derartige Affinitäts-Chromatographie-Technik unter Einsatz eines bestimmten Antikörpers kann vorteilhaft mit der herkömmlichen Methode zur Reinigung des Human-TNF kombiniert werden.

Die herkömmlichen Reinigungsmethoden für die physiologisch aktiven Substanzen sind jedoch sehr arbeitsaufwendig, weil derartige Verfahren viele Schritte von Reinigungsvorgängen nach obiger Darstellung umfassen, und daher können sie nicht mit Erfolg für die Durchführung der Reinigung von rohem TNF im großtechnischen Maßstab angewandt werden. Darüber hinaus ist festzustellen, daß es für die Durchführung der Affinitäts-Chromatographie-Technik unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers als Adsorptionsmittel, wobei diese Technik als eine vorteilhafte Technik nach obiger Darstellung angesehen wird, erforderlich ist, daß eine große Menge des spezifischen Antikörpers gegen eine physiologisch aktive Substanz in gleichbleibender Qualität gewonnen wird. Der spezifische Antikörper kann von einem Säugetier durch Immunisierung des Säugetieres mit der physiologisch aktiven Substanz oder aus der Kultur von antikörpererzeugenden Zellen gewonnen werden. Allerdings kann eine große Menge des spezifischen Antikörpers nicht beständig in einer gleichbleibenden Qualität weder von dem immunisierten Säugetier noch von der Kultur der antikörpererzeugenden Zellen gewonnen werden. Das hat folgenden Grund. Wenn ein immunisiertes Säugetier für die Gewinnung des spezifischen Antikörpers verwendet wird, ist die Züchtung der antikörpererzeugenden Zellen im großen Maßstab eine schwierige Aufgabe, und außerdem sind die antikörpererzeugenden Zellen nicht unbedingt beständig. Das heißt, es ist schwierig, einen spezifischen Antikörper mit einer einheitlichen Qualität in Mengen zur Verfügung zu stellen. Daher kann die physiologisch aktive Substanz nicht mit Hilfe der Affinitäts-Chromatographie unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers als Adsorptionsmittel großtechnisch beständig gereinigt werden. Aus den oben angeführten Gründen kann die Reinigung der physiologisch aktiven Substanz mit Hilfe einer der herkömmlichen Methoden im großen nicht beständig und wirksam erreicht werden. So weit es den Erfindern bekannt ist, gab es keinen Bericht, in dem die Reinigung von durch Rekombinant-DNA-Technik erzeugtem Human-TNF untersucht wurde. Unter diesen Umständen kann die wirksame und beständige Lieferung des im wesentlichen reinen Human-TNF, vor allem im kommerziellen Umfang, nicht gewährleistet werden, trotz der Kenntnisse, daß Human-TNF eine wirksame Antitumor-Medizin ist.

Zur Behebung der oben in bezug auf die Reinigung von Human-TNF genannten Schwierigkeiten haben die Erfinder ausgedehnte und intensive Untersuchungen unternommen. Als ein Ergebnis wurde ganz überraschend gefunden, daß, wenn eine Human-TNF in roher Form enthaltende wäßrige Lösung auf eine mit farbstoffgebundenem vernetztem Agarosegel gefüllte Säule aufgegeben wird, Human-TNF speziell auf dem Farbstoff adsorbiert wird und anschließend Human-TNF auseluiert wird, wobei ein Elutionsmittel verwendet wird, dessen pH-Wert oder dessen Salzkonzentration höher als die der auf die Säule aufgegebenen Lösung ist, wodurch Human-TNF in im wesentlichen reiner Form beständig und wirksam mit hoher Rückgewinnung gewonnen wird. Die Erfindung wurde auf der Basis dieser neuen Erkenntnisse vollendet.

Ziel der Erfindung

Mit der Erfindung wird ein Verfahren zur Reinigung einer durch Rekombinant-DNA-Technik erzeugten physiologisch aktiven Substanz zur Verfügung gestellt. Der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnene Human-TNF besitzt eine ausgezeichnete Antitumor-Wirkung und stammt vom Menschen. Daher ist der gewonnene Human-TNF besonders nützlich, wenn der Human-TNF klinisch als Antitumor-Medizin verabreicht wird.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Die Aufgabe der Erfindung besteht daher in der Schaffung eines Verfahrens zur Reinigung von durch Rekombinant-DNA-Technik erzeugter Human-TNF.

Die oben genannte und andere Aufgaben, Merkmale und Vorteile der Erfindung werden Fachleuten aus der folgenden ausführlichen Beschreibung und den beigefügten Ansprüchen in Verbindung mit den begleitenden Zeichnungen deutlich werden, in denen darstellen:

Fig. 1: die Restriktions-Karten von Plasmid-Inserts, von denen jedes eine DNA-Kodierung für einen herkömmlichen Kaninchen-TNF enthält;

Fig. 2: das Flußdiagramm des Verfahrens zur Herstellung einer Rekombinant-DNA (pTNF-lac-1), die für den herkömmlichen Kaninchen-TNF kodiert;

- Fig. 3: das Flußdiagramm des Verfahrens zur Herstellung einer anderen Rekombinant-DNA (pTNF-lacUV5-1), die für den herkömmlichen Kaninchen-TNF kodiert;
 Fig. 4: die Restriktionskarte des Teiles eines Plasmids, das ein Gen für Human-TNF zur erfindungsgemäßen Verwendung enthält;
 Fig. 5: die Restriktionskarte des Teiles eines Plasmids, das ein Gen für einen herkömmlichen Kaninchen-TNF enthält;
 Fig. 6: das Flußdiagramm des Verfahrens zur Herstellung einer Rekombinant-DNA (pHTNF-lacUV5-1), die für Human-TNF zur erfindungsgemäßen Verwendung kodiert; und
 Fig. 7: das Flußdiagramm des Verfahrens zur Herstellung einer anderen Rekombinant-DNA (pHTNF-lacUV5-2), die für die erfindungsgemäß zu verwendende physiologisch aktive Substanz kodiert.

Erfindungsgemäß wird ein Verfahren zur Reinigung einer physiologisch aktiven Substanz zur Verfügung gestellt, bei dem eine physiologisch aktive Substanz in roher Form enthaltende wäßrige Lösung der Säulenchromatographie unterzogen wird, wobei eine mit einem farbstoffgebundenen vernetzten Agarosegel gefüllte Säule verwendet wird, wobei das farbstoffgebundene Agarosegel aus einem vernetzten Agarosegel als Träger und einem kovalent daran gebundenen Farbstoff als Liganden besteht,

wobei es sich bei der physiologisch aktiven Substanz um eine solche handelt, die durch Rekombinant-DNA-Technik unter Verwendung einer Rekombinant-DNA erzeugt wird, die eine für die physiologisch aktive Substanz kodierende DNA enthält und die zytotoxische Aktivität gegen L-M-Zellen besitzt und in der Lage ist, hämorrhagische Necrose von transplantiertem Meth A Sarcom in der BALB/c Maus zu induzieren.

Wie oben erwähnt, handelt es sich bei der für die erfindungsgemäße Verwendung vorgesehenen physiologisch aktiven Substanz um eine, die mit Hilfe einer herkömmlichen Rekombinant-DNA-Technik unter Verwendung einer Rekombinant-DNA hergestellt wird, die eine für die physiologisch aktive Substanz kodierende DNA enthält. Wenn Human-TNF Analysen nach später zu beschreibenden Verfahren unterzogen wird, zeigt Human-TNF zytotoxische Aktivität gegen L-M-Zellen und induziert hämorrhagische Necrose von transplantiertem Meth A Sarcom in der BALB/c Maus. Der Human-TNF ist speziell ein Polypeptid mit einer durch die folgende Formel (I) dargestellten Aminosäuresequenz:

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

worin Gln für einen Glutaminrest steht, Asp einen Asparaginsäurerest, Pro einen Prolinrest, Tyr einen Tyrosinrest, Val einen Valinrest, Lys einen Lysinrest, Glu einen Glutaminsäurerest, Ala einen Alaninrest, Asn einen Asparaginrest, Leu einen Leucinrest, Phe einen Phenylalaninrest, Gly einen Glycinrest, His einen Histidinrest, Ser einen Erinrest, Thr einen Threoninrest, Ile einen Isoleucinrest, Trp einen Tryptophanrest, Arg einen Argininrest, Met einen Methioninrest und Cys einen Cysteinrest.

Der die oben genannte Aminosäuresequenz aufweisende Human-TNF kann durch eine herkömmliche Rekombinant-DNA-Technik unter Verwendung einer Rekombinant-DNA hergestellt werden, die eine für die physiologisch aktive Substanz kodierende DNA enthält, die mindestens eine Basensequenz aufweist, die aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einer durch die folgende Formel (II) dargestellten Basensequenz und einer zu der Basensequenz komplementären Basensequenz besteht:

TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT GAC AAG CCT GTA GCC CAT GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGC CGG GCC AAT GCC CTC CTG GCC AAT GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC TTC AAG GGC CAA GGC TGC CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT GCC ATC AAG AGC CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG AAG GGT GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CGG CCC GAC TAT CTC GAC TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTG

worin A für einen Desoxyadenylsäurerest steht, G für einen Desoxyguanylsäurerest, C einen Desoxycytidylsäurerest und T einen Thymidylsäurerest und worin das linke Ende und das rechte Ende der Formel (II) eine 5'-Hydroxylgruppenseite bzw. 3'-Hydroxylgruppenseite darstellen.

Der oben genannte Human-TNF und die oben genannte DNA können auf folgende Weise gewonnen werden:

1. Eine Bakteriophage λ /Kaninchen-Genom-Sammlung und eine Bakteriophage λ /Human-Genom-Sammlung, hergestellt von Prof. T. Maniatis, Department of Biochemistry und Molecular Biology, Harvard University, 7 Divinity Avenue, Cambridge, Massachusetts 02138, USA, werden verwendet. Diese Stoffe können mit Hilfe der folgenden Verfahrensweisen hergestellt werden (siehe Cell, **15**, S. 687 [1978]):

- (1) Kaninchen- oder Menschengewebe, zum Beispiel Kaninchen- oder Menschenpankreasgewebe, werden zu gefrorenem Pulver reduziert und zur Digestion von RNA und Eiweißstoffen behandelt und ergeben nach der Präzipitation hochmolekulare Kaninchen- oder Human-DNA;
- (2) die hochmolekulare DNA wird teilweise zur willkürlichen Abtrennung hinsichtlich der Gen-Stelle digeriert;
- (3) die resultierenden DNA-Fragmente werden größenfraktioniert und ergeben von 15 bis 20 Kilobasenpaar (KB)-Fragmente;
- (4) die resultierenden Fragmente von Schritt 3 werden unter Verwendung eines λ -Charon-4A-Phagenvektors gekloniert; und
- (5) die resultierenden Vektoren werden in vitro zu infektiösen Phagenpartikeln, die rDNA enthalten, gepackt, um die oben genannte Kaninchen- oder Human-Genom-Sammlung zu erhalten.

2. Die im Bezugsbeispiel 1 gewonnene Kaninchen-TNF-cDNA wird nach der Einschnitt-Translationsmethode von P. W. J. Rigby u. a. (siehe J. Mol. Biol., **113**, S. 237 [1977]) ^{32}P -markiert.

3. Jede der Bakteriophagen λ /Kaninchen-Genom-Sammlung und Bakteriophagen λ /Human-Genom-Sammlung wird bis zum tatsächlichen Zusammenfließen auf einem Bakterienrasen ausgestrichen und in bezug auf Hybridisierung mit der ^{32}P -markierten Kaninchen-TNF-cDNA gescreent.

4. Von den geeigneten Klonen wird die entsprechende DNA isoliert, restriktionskardiert und durch Southern-Hybridisierung analysiert (siehe E. M. Southern, J. Mol. Biol., **98**, S. 503 [1975]).

Kaninchen- oder Human-TNF-Gene enthaltende Restriktionsfragmente werden in Plasmidvektoren subklont und anschließend sequenziert.

5. Die Basensequenz der Kaninchen-TNF-cDNA wird mit der des Kaninchen-TNF-Gens verglichen, um die Exone (bestimmte Sequenzen von Basen, die für die Aminosäuresequenz von Kaninchen-TNF kodieren) und die Introne (bestimmte Sequenzen von Basen, die nicht für die Aminosäuresequenz von Kaninchen-TNF kodieren) des Kaninchen-TNF-Gens zu bestimmen.

6. Anschließend wird die Basensequenz des Human-TNF-Gens mit der des Kaninchen-TNF-Gens verglichen, um die Exone und Introne des Human-TNF-Gens zu bestimmen.

7. Die Aminosäuresequenz von Kaninchen-TNF, die von der Basensequenz deduziert wurde, die durch Auslöschern der Introne des Kaninchen-TNF-Gens und Kombinieren der Exone davon gewonnen wurde, wird als mit der von der Basensequenz der Kaninchen-TNF-cDNA deduzierten übereinstimmend bestätigt.

8. Als nächstes wird die Aminosäuresequenz des für die Erfindung zu verwendenden Human-TNF von der Basensequenz der für den Human-TNF kodierenden DNA deduziert, die durch Auslöschung der Introne des für den Human-TNF kodierenden Gens und Kombinieren von deren Exonen gewonnen wurde. Die Aminosäuresequenz des Human-TNF wird als teilweise mit der des Kaninchen-TNF übereinstimmend bestätigt.

9. Dann wird die für den Human-TNF kodierende DNA in vitro für die Insertion in ein passendes Expressionvehikel angepaßt, um die kodierende DNA enthaltende Rekombinant-DNA zu bilden. Die Rekombinant-DNA wird zur Transformation einer passenden Wirtszelle verwendet, die ihrerseits in einer Kultur wachsen und den verlangten Human-TNF verwirklichen kann.

10. Der auf diese Weise erzeugte Human-TNF hat 155 Aminosäurereste in seiner ausgereiften Form, beginnend mit Serin. Wenn er ein Signalpeptid in seiner Präsequenz besitzt, hat das Signalpeptid eine sehr hydrophobe Beschaffenheit. Oben wurden die Verfahrensweisen für die Gewinnung des für den Human-TNF kodierenden Gens, die Basensequenzen der für den Human-TNF kodierenden DNA und die Verfahren für die Erzeugung von Human-TNF durch die Verwendung der DNA offenbart. Man sollte aber beachten, daß durch die obige Beschreibung nicht beabsichtigt ist, das Verfahren zu begrenzen, und daß einleuchtende Veränderungen von Fachleuten vorgenommen werden können.

Infolge der variablen Anwendungshäufigkeit eines Codons (genetischen Codes), der jeder Aminosäure entspricht, und aus anderen Gründen, kann ein teilweiser oder vollständiger Abschnitt der Basensequenz der für Human-TNF kodierenden DNA durch eine organochemisch synthetisierte künstliche DNA ersetzt werden, ohne daß dadurch die Aminosäuresequenz des daraus gewonnenen Polypeptids verändert würde.

Wahrscheinlich kann der Human-TNF intrazellulär in unausgereifter Form als ein Präpeptid oder Präpropeptid erzeugt werden, das über eine Zwischenform zu einem ausgereiften Human-TNF im Verarbeitungsstadium verarbeitet werden kann. Die unausgereifte Form von Human-TNF kann von der Basensequenz des Human-TNF-Gens deduziert werden. Die DNA, die eine den Human-TNF in unausgereifter oder Zwischenform verschlüsselnde DNA aufweist, kann gleichfalls mit einer natürlichen oder künstlich synthetisierten DNA rekombiniert werden.

Eine Anwendungsmöglichkeit dieser Technik könnte die Einfügung des Methionincodons (ATG) in das 5'-Ende und die Einfügung mindestens eines unter TAA, TAG und TGA ausgewählten Stoppcodons in das 3'-Ende der ausgereiften oder Zwischen- oder unausgereiften TNF-DNA umfassen. Infolge des Vorhandenseins des Methionincodons kann der ausgereifte oder Zwischen- oder unausgereifte Human-TNF an der mit Hilfe eines entsprechenden Promotors synthetisierten mRNA erzeugt werden. Allerdings wird der an den N-Terminus des Human-TNF angefügte Methioninrest je nach der Art der verwendeten Wirtszelle gespalten oder nicht gespalten. Durch das Einfügen des Stoppcodons soll die Translation der mRNA, die von der für die physiologisch aktive Substanz kodierenden DNA transkribiert wurde, an einer passenden Position (C-Terminus von Polypeptid der Formel I) gestoppt werden.

Eine andere Anwendungsmöglichkeit dieser Technik könnte die Zugabe einer stark hydrophoben Basensequenz, die als „Signalsequenz“ bekannt ist, zu der DNA umfassen. Durch diese Zugabe könnte es möglich werden, den Human-TNF nach außerhalb der Wirtszelle, oder im Falle eines gramnegativen Bakteriums, in den als „Periplasma“ bekannten Raum auszuscheiden.

Wenn ein Vektor mit einem eingebauten Startcodon verwendet wird, kann ein verschmolzenes Peptid erzeugt werden, das aus dem Human-TNF und einem auf den Vektor zurückzuführenden Peptid besteht. In diesem Fall kann das verschmolzene Peptid chemisch oder enzymatisch gespalten werden. Alternativ kann das verschmolzene Peptid auch, wenn die Hauptaktivität des Human-TNF nicht nachteilig beeinflusst wird, so wie es ist verwendet werden.

Die für Human-TNF kodierende DNA kann in ihrer vor dem 5'-Ende liegenden Region mit der Gensequenz eines Promotors verbunden werden, um dadurch eine TNF-DNA-Promotorsequenz zu erhalten, die ihre Replikation nicht behindert und nicht dazu führt, daß die Translation der resultierenden RNA nachteilig beeinflusst wird. Die auf diese Weise gewonnene TNF-DNA-Promotorsequenz kann mit einem in einer Bakterien- oder Zelle eines höheren Organismus replizierbaren Vektor kombiniert werden, um eine Rekombinant-DNA zu erhalten. Die so gewonnene Rekombinant-DNA kann zur Transformation einer als Wirt verwendeten Bakterien- oder Zelle eines höheren Organismus verwendet werden. Der dabei gewonnene Transformant kann zur Expression der für den Human-TNF kodierenden DNA gezüchtet werden, um den Human TNF zu erzeugen.

Wenn *Escherichia coli* als der oben genannte Wirt verwendet wird, dann können als der geeignete Wirt verschiedene Mutantenstämme von *E. coli* K-12 angeführt werden, wie HB 101 (ATCC33694), C600K (ATCC33955), D1210, RRI (ATCC31343), MC 1061, LE392 (ATCC33572), JM 101 (ATCC33876), JM83 (J. Vieira und J. Messing, Gene, 19, 259-268 [1982]), JM 103 (Ray Wu, u. a., Method in Enzymology, Bd. 101, Academic Press, New York) und X1776 (ATCC31244). Wenn der *E. coli*-Wirt verwendet wird, dann können als der geeignete Vektor Plasmide wie pBR322, pBR325, pBR327, pUC3, pUC9, pMB9 (ATCC37019) pJB8 (ATCC37074) und pKC7 (ATCC37084), λ -Phagen wie λ gt, λ B und Charon 4A und M13 Phage genannt werden. Damit die aktive Substanz in der *E. coli* Zelle erzeugt wird, kann ein unter den Promotoren der *E. coli* und Phagengene ausgewählter Promotor eingesetzt werden. Beispiele für den geeigneten Promotor umfassen die Gene für Lactoseabbauenzym (LAC), UV5-Mutanten davon, Penicillinase (BLA) und Tryptophansynthetase (TRP), λ -Phage P_L-Promotor und tac-Promotor, bei dem es sich um einen verschmolzenen Promotor von Tryptophansynthetase und Lactoseabbauenzym handelt.

Wenn *Bacillus subtilis* als der Wirt verwendet wird, dann sind als der geeignete Wirt BD 170 Stamm (ATCC33608), BR 151 Stamm (ATCC33677) und MI 112 Stamm (ATC33712) zu nennen. Wird der *Bacillus subtilis* Wirt eingesetzt, dann sind als der geeignete Vektor die Plasmide pC 194 (ATCC37034), pUB 110 (ATCC37015), pSA2100 (ATCC37014) und PE 194 zu nennen. Außerdem können bei Verwendung des *Bacillus subtilis* Wirtes die Gene Chloramphenicolacetylierungsenzym (CAT), Penicillinase und Anti-Erythromycin als der geeignete Promotor angesehen werden.

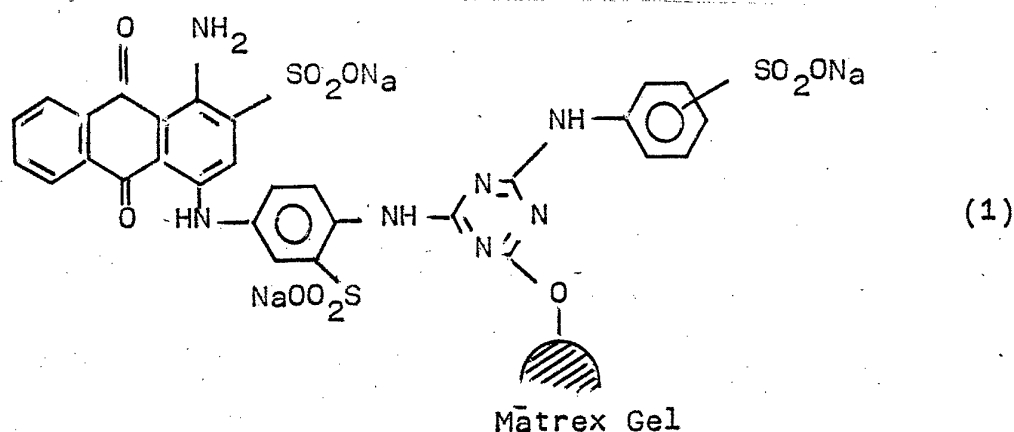
Wenn eine Hefe als der Wirt verwendet wird, so kommen als der geeignete Wirt Stämme von *Saccharomyces cerevisiae* wie RH 218 (ATCC44076), SHY 1 (ATCC44769), SHY 3 (ATCC44771), D 131 A, 483 und 830 in Frage. Wenn der Hefewirt verwendet wird, so können als der geeignete Vektor Plasmide wie YEp 13, (ATCC37115), YEp 6, YRp 7 und Ylp 5 angeführt werden. Außerdem sind bei Verwendung des Hefewirtes als geeigneter Promotor die Gene für Säurephosphatase, Alkoholdehydrogenase (ADH1), Tryptophansynthetase (TRP), Phosphoglyceratkinase (PGK), Cytochrom B (COB) und Actin zu nennen.

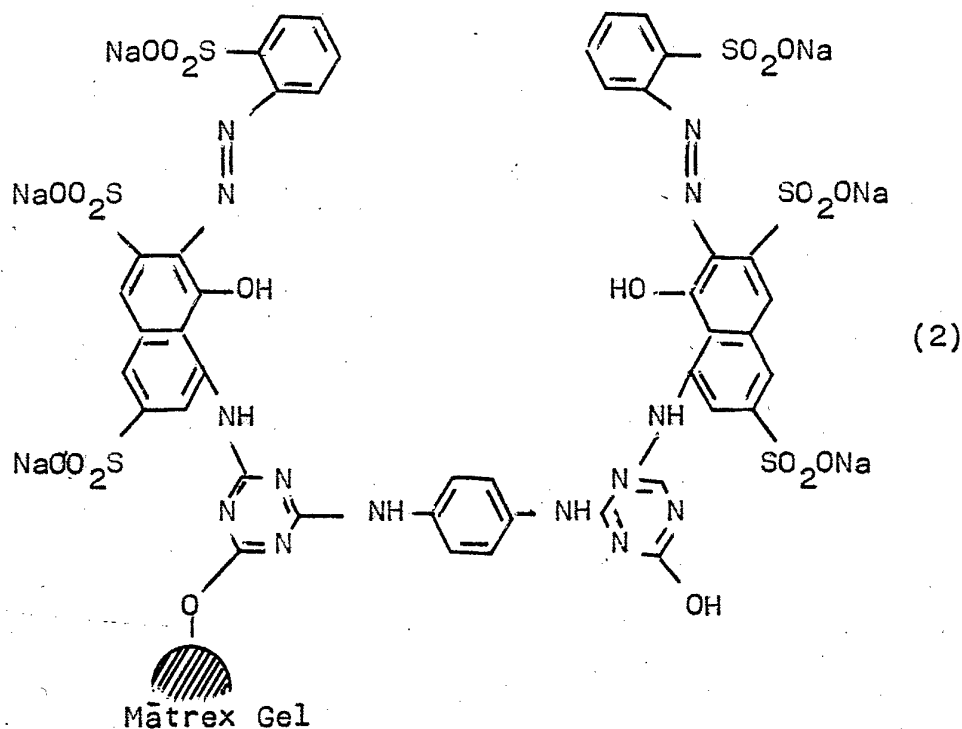
Der auf diese Weise erzeugte Transformant wird nach einem herkömmlichen Verfahren im großen gezüchtet, um den verlangten Human-TNF zu erzeugen. Wenn ein Transformant verwendet wird, der den Human-TNF ausscheiden kann, wird die überstehende Flüssigkeit der Kultur des Transformanten als wäßrige Lösung gesammelt, die ungereinigten Human-TNF enthält. Andererseits werden, wenn ein Transformant verwendet wird, der den Human-TNF nicht ausscheiden kann, sondern den darin befindlichen Human-TNF ansammelt, die gezüchteten Zellen des Transformanten gesammelt und lysiert, um dadurch einen lysierten Zellextrakt als wäßrige Lösung, die ungereinigten Human-TNF enthält, zu gewinnen.

Die dadurch gewonnene und ungereinigten Human-TNF enthaltende wäßrige Lösung kann direkt der Säulenchromatographie unterzogen werden, bei der eine mit einem erfindungsgemäßen farbstoffgebundenen vernetzten Agarosegel gefüllte Säule verwendet wird. Alternativ kann, bevor die erfindungsgemäße Säulenchromatographie vorgenommen wird, die ungereinigten Human-TNF enthaltende wäßrige Lösung teilweise gereinigt werden, wobei die unten angeführte herkömmliche biochemische Technik einzeln oder in Kombination angewandt wird, um eine wäßrige Lösung zu erhalten, die den teilweise gereinigten Human-TNF enthält. Als geeignetes biochemisches Verfahren zur teilweisen Reinigung von Human-TNF sind beispielsweise eine Aussalzungsmethode unter Verwendung von Ammoniumsulfat, eine Ionenaustauschchromatographie zur Entfernung eiweißhaltiger Verunreinigungen unter Verwendung eines Anionenaustauscherharzes wie DEAE-Sephrose (Pharmacia Fine Chemical AB, Schweden), Behandlung mit einer wäßrigen Polymyxin-P-Lösung zur Entfernung von Nucleinsäuren, Wärmebehandlung zur Entfernung eiweißhaltiger Verunreinigungen, eine Gelfiltrationstechnik, eine Elektrophoresetechnik und dergleichen zu nennen.

Wie oben erwähnt, wird bei dem erfindungsgemäßen Verfahren eine physiologisch aktive Substanz in roher Form enthaltende wäßrige Lösung der Säulenchromatographie unter Verwendung einer mit einem farbstoffgebundenen vernetzten Agarosegel gefüllten Säule unterzogen. Die eine physiologisch aktive Substanz in roher Form enthaltende wäßrige Lösung (anschließend häufig als „wäßrige rohe physiologisch-aktive Substanz-Lösung“ bezeichnet), die für die Erfindung verwendet werden soll, enthält sowohl die oben genannten ungereinigten Human-TNF enthaltenden wäßrigen Lösungen als auch teilweise gereinigten Human-TNF enthaltende wäßrige Lösungen.

Ein erfindungsgemäß vorgesehenes farbstoffgebundenes vernetztes Agarosegel kann durch kovalente Bindung eines Farbstoffes als einen Liganden an ein vernetztes Agarosegel als Träger nach einer Triazin-Kopplungsmethode von Böhme, u. a., (J. Chromatogr., **69**, S. 209-214 [1972]) hergestellt werden. Als vernetztes Agarosegel kann jedes im Handel erhältliche vernetzte Agarosegel, z. B. Sepharose (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemicals AB, Schweden) eingesetzt werden. Als erfindungsgemäß zu verwendender Farbstoff sind beispielsweise Cibacron Blue F3GA (Farbindexbezeichnung: Reaktivfarbstoff Blau 2), Procion Red HE3B (Farbindexbezeichnung: Reaktivfarbstoff Rot 120), Green A (zu beziehen von Amicon Corporation, USA, in Form von Green A-gebundenem Agarosegel unter dem Warenzeichen „Matrex Gel Green A“) und dergleichen anzuführen. Die chemischen Strukturen von Cibacron Blue F3GA und Procion Red HE3B werden durch die folgenden Formeln (1) bzw. (2) dargestellt, in denen sie in Form eines Cibacron Blue F3GA-gebundenen vernetzten Agarosegels (Matrex Gel Blue A) bzw. Procion Red HE3B-gebundenen vernetzten Agarosegels (Matrex Gel Red A) (jeweils hergestellt und vertrieben von Amicon Corporation, USA) gezeigt werden.





Die farbstoffgebundenen vernetzten Agarosegele sind im Handel erhältlich. Als Cibaron F3GA-gebundenes vernetztes Agarosegel empfiehlt sich beispielsweise die Verwendung von Blue Sepharose CL-6B (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemical AB, Schweden), Affigel Blue (hergestellt und vertrieben von Bio Rad Laboratories, USA), Mätrex Gel Blue A (hergestellt und vertrieben von Amicon Corporation, USA) und dergleichen. Als das Procion Red HE3B-gebundene vernetzte Agarosegel empfiehlt sich zum Beispiel Mätrex Gel Red A (hergestellt und vertrieben von Amicon Corporation, USA) und dergleichen. Als das Green A-gebundene vernetzte Agarosegel empfiehlt sich Mätrex Gel Green A (hergestellt und vertrieben von Amicon Corporation, USA) und dergleichen.

Das oben erläuterte farbstoffgebundene vernetzte Agarosegel wird in eine Säule eingefüllt und für die Säulenchromatographie verwendet. Die erfindungsgemäße Säulenchromatographie wird wie folgt ausgeführt.

Die mit einem farbstoffgebundenen vernetzten Agarosegel gefüllte Säule wird mit einem 0,1 M NaCl enthaltenden Puffer (pH-Wert 5,5 bis 6,5) ausreichend äquilibriert. Als Puffer können beispielsweise Phosphatpuffer und dergleichen verwendet werden. Auf die in dieser Weise äquilibrierte Säule wird eine wäßrige rohe-physiologisch-aktive-Substanz-Lösung aufgebracht. Es empfiehlt sich, den pH-Wert der wäßrigen rohe-physiologisch-aktive-Substanz-Lösung auf 5,5 bis 6,5 einzustellen.

Anschließend wird die Säule mit dem gleichen oben genannten Puffer gründlich gewaschen. Danach wird die Eluierung vorgenommen, wobei als Eluierungsmittel ein Puffer verwendet wird, dessen Natriumchloridkonzentration höher als die des für die Äquilibrierung der Säule verwendeten Puffers ist, zum Beispiel ein Puffer, der 0,5 M oder mehr NaCl enthält. Alternativ kann die Eluierung auch unter Verwendung eines Puffers mit einem pH-Wert von 8,0 oder höher als Eluierungsmittel ausgeführt werden. Auf diese Weise wird eine Fraktion gewonnen, die den Human-TNF in im wesentlichen reiner Form enthält.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens kann der Human-TNF in im wesentlichen reiner Form und in hoher Ausbeute gewonnen werden. Außerdem kann das farbstoffgebundene vernetzte Agarosegel im Gegensatz zu dem herkömmlichen spezifischen antikörpergebundenen vernetzten Agarosegel wiederholt mit Erfolg unter verhältnismäßig harten Bedingungen dauerhaft verwendet werden. Erfindungsgemäß kann Human-TNF daher gleichbleibend im großen bei geringen Kosten gereinigt werden. Des weiteren ist zu erwähnen, daß die Behandlung eines für die Säulenchromatographie vorgesehenen Adsorptionsmittels mit einer wäßrigen alkalischen Lösung zur Entfernung von Pyrogenen, die im Adsorptionsmittel enthalten sind und unerwünschte Verunreinigungen bei pharmazeutischer Verwendung darstellen, bekannt ist, und daß ebenso die Sterilisation eines für die Säulenchromatographie vorgesehenen Adsorptionsmittels mit Hilfe eines Autoklaven bekannt ist. Allerdings kann weder eine Behandlung mit einer wäßrigen alkalischen Lösung noch die Sterilisation mit Hilfe eines Autoklaven für ein bei herkömmlichen Affinitäts-Chromatographietechniken vorgesehenes antikörpergebundenes vernetztes Agarosegel angewandt werden, weil es gegenüber einer alkalischen Bedingung oder Hitze nicht resistent sein kann. Im Gegensatz dazu ist das erfindungsgemäß zu verwendende farbstoffgebundene vernetzte Agarosegel gegenüber einer wäßrigen alkalischen Lösung und Hitze resistent und kann daher der Behandlung mit einer wäßrigen alkalischen Lösung unterzogen werden, so daß Pyrogene, bei denen es sich um unerwünschte, in dem farbstoffgebundenen Agarosegel enthaltene Verunreinigungen bei pharmazeutischer Verwendung handelt, leicht entfernt werden können, und die Sterilisation unter Verwendung eines Autoklaven erfolgen kann.

Der auf diese Weise gereinigte Human-TNF besitzt eine Antitumor-Aktivität und übt dabei keine toxische Wirkung auf normale Zellen aus. Zum Beispiel wird bei einem in vivo Versuch (der später erläutert wird), bei dem Meth A Sarcom in eine Maus transplantiert wurde, die Aktivität bei Verabreichung von 300 Einheiten des erfindungsgemäß gewonnenen gereinigten Human-TNF an die Maus mit (+) bewertet. Auch eine erhebliche Wachstumsinhibition oder Regression des Krebses wird nach Verabreichung des gereinigten Human-TNF bei den Mäusen, denen Colon-Karzinom Colon 26 transplantiert wurde, im Vergleich zu den Kontrollmäusen beobachtet, denen eine physiologische Kochsalzlösung injiziert worden war. Außerdem wird die zytotoxische Wirksamkeit des gereinigten Human-TNF gegenüber verschiedenen Krebszellen in fast der gleichen Weise wie bei der in vitro Versuchsmethode, die später erläutert wird, ermittelt, nur wurden KB-Zellen (Adenocarcinom), PC-8-Zellen (Lungenkrebs) und normale Zellen (fetale Human-Nierenzellen und fetale Human-Vorhautzellen) als Kontrollen anstelle von L-M-Zellen verwendet und die Zellen 72 Stunden lang bei 32°C inkubiert und nicht 48 Stunden lang bei 37°C.

Wie oben erläutert, besitzt der nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gewonnene Human-TNF eine ausgezeichnete Antitumor-Wirkung und stammt vom Menschen. Daher ist der erfindungsgemäß gewonnene Human-TNF besonders nützlich, wenn der Human-TNF klinisch als Antitumor-Medizin verabreicht wird.

Anschließend wird das bei der Beurteilung der Antitumor-Wirkung des nach dem erfindungsgemäßen Verfahren gereinigten Human-TNF angewandte Analyseverfahren ausführlich erläutert.

(1) In vivo Analyseverfahren (Analysemethode unter Verwendung von Mäusen, denen Meth A Sarcom transplantiert wurde)
Als das in vivo-Verfahren ist beispielsweise die Methode von Carswell, u. a., Proc. Nat. Acad. Sci USA, **72**, (1975) 3666 zu nennen. Das von den Erfindern angewandte Verfahren wurde durch Verbesserung der oben genannten Methoden entwickelt. Bei dem Verfahren werden Meth A Sarcom-Zellen (2×10^5 Zellen) intradermal in jede der BALB/c-Mäuse transplantiert. Nach 7 Tagen werden Mäuse mit Tumoren mit einem Durchmesser von 7 bis 8 mm, ohne hämorrhagische Necrose und guter Vaskularisierung für die Beurteilung ausgewählt. Eine Probe des mit einer physiologischen Kochsalzlösung verdünnten Human-TNF (0,5 ml) wird durch die Schwanzvene jeder Maus injiziert. Die Wirksamkeit der Probe wird nach 24 Stunden nach folgendem Kriterium bewertet:

(-): keine Veränderung

(+): leichte hämorrhagische Necrose

(++): mittlere hämorrhagische Necrose (zentrale Necrose, die sich über annähernd 50 % der transplantierten Tumoroberfläche erstreckt)

(+++): ausgeprägte hämorrhagische Necrose (massive Necrose in der Mitte des transplantierten Tumors, wobei ein kleiner lebensfähiger Rand an der Tumorpheripherie übrig ist)

(2) In vitro Analyseverfahren (Analysemethode unter Verwendung von L-M-Zellen)

Als das in vitro Verfahren zur Beurteilung der Wirksamkeit von Human-TNF ist beispielsweise das Verfahren von Ruff (Lymphokines, Bd. 2, herausgegeben von E. Pick, Academic Press, N. Y. [1980] 235) und die Methode aus (J. Immunol., **126**, [1981] 1279) zu erwähnen.

Das von den Erfindern angewandte Verfahren wurde durch Verbesserung der oben genannten Methoden entwickelt. Das erfindungsgemäße Verfahren, bei dem die zytotoxische Aktivität von Human-TNF gegenüber L-M-Zellen (American Type Culture Collection CCL 1,2) gemessen wird, wird wie folgt ausgeführt. Eine serienweise mit dem Medium und der L-M-Zellen-Suspension (0,1 ml, 1×10^5 Zellen/ml) verdünnte Probe (0,1 ml) des Human-TNF wird in jede Vertiefung von 96-Vertiefungen-Mikrotiter-Platten (Flow Laboratories, Inc. USA) gegeben. Als Medium diente Eagle's minimal essentielles Medium, das 10 V/V% fetales Kalbsserum enthielt (die Zusammensetzung wird zum Beispiel in Tissue Culture, herausgegeben von Junnosuke Nakai, u. a., Asakura Shoten, 1967 beschrieben). Die Platten werden bei 37°C 48 Stunden lang in einer 5% Kohlendioxid enthaltenden Luft inkubiert. Nach Beendigung der Kulturperiode werden 20 µl einer 20%igen wässrigen Lösung von Glutaraldehyd zum Festigen der Zellen zugesetzt. Nach der Fixierung werden die Platten gewaschen und zum Trocknen stehen gelassen, und es wird 0,1 ml 0,05%ige Methylenblaulösung zum Färben der lebensfähigen Zellen zugegeben. Die Platten werden gründlich zur Entfernung von überschüssigem Methylenblau gewaschen und trocknen gelassen. Anschließend wird 3%ige Chlorwasserstoffsäure in jede Vertiefung gegeben, um das Methylenblau aus den gefärbten Zellen zu extrahieren. Das Absorptionsvermögen jeder Vertiefung bei 665 nm wird mit Titertek Multiskan (Flow Laboratories, Inc. USA) gemessen. Das Absorptionsvermögen ist der Anzahl von lebensfähigen Zellen proportional. Die Verdünnung des Human-TNF, durch die das Absorptionsvermögen der Substanz gleich 50% des Absorptionsvermögens der Kontrollgruppe wird, der keine Probe des Human-TNF zugesetzt worden war, wird durch ein Diagramm oder durch Berechnung erhalten. Die Verdünnung wird als eine Einheit (U)/ml angegeben.

(3) Eiweißbestimmung

Die Eiweißmenge wird nach einem Verfahren von Lowry, u. a., (J. Biol. Chem., **193**, S. 265 [1951]) bestimmt.

Die Erfindung wird anschließend ausführlich unter Bezugnahme auf die folgenden Bezugsbeispiele, Arbeitsbeispiele und Vergleichsbeispiele beschrieben.

Bei der praktischen Ausführung der Erfindung werden die Konstruktion einer Rekombinant-DNA und das Einfügen einer Rekombinant-DNA in einen Mikroorganismus in Übereinstimmung mit der in den folgenden Versuchsberichten beschriebenen Verfahrensweise ausgeführt.

(1) Yasutaka Takagi, Manual for Genetic Engineering, Kodan-sha

(2) Yasutaka Takagi, Experimental Method in Genetic Engineering, Kodan-sha

(3) T. Maniatis, E. F. Fritsch, J. Sambrook, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, USA

(4) Ray Wu, u. a., Method in Enzymology, Bd. 101, Academic Press, USA.

Außerdem wird die Rückgewinnung in den folgenden Beispielen und Vergleichsbeispielen durch die folgende Gleichung bestimmt:

$$\text{Rückgewinnung (\%)} = \frac{\text{Gesamtmenge (Einheiten) des Human-TNF in der durch Reinigungsschritte gewonnenen Fraktion}}{\text{Gesamtmenge (Einheiten) von Human-TNF in der Rohlösung}} \times 100$$

Darüber hinaus wird der Reinigungsgrad durch die folgende Gleichung bestimmt:

$$\text{Reinigungsgrad (Male)} = \frac{\text{Spezifische Aktivität (U/mg) von Human-TNF in der durch die Reinigungsschritte gewonnenen Fraktion}}{\text{Spezifische Aktivität (U/mg) des Kulturextraktes}}$$

Ausführungsbeispiele

In den Bezugsbeispielen und Beispielen verwendete Abkürzungen

MOPS:	Morpholinopropansulfonsäure
LB Medium:	Luria-Bertani Medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
PFU:	Plaque-Bildungseinheit
EDTA:	Ethylendiamintetraessigsäure
SDS:	Natriumdodecylsulfat
BRL:	Bethesda Research Laboratories Inc.
DMT:	Dimethoxytrityl
lac:	Lactose
Tris:	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
XAR-5:	Röntgenfilm, hergestellt und vertrieben von Eastman Kodak Company, USA
1 × SSC:	0,15 M NaCl + 0,015 M Natriumcitrat, pH-Wert 7
2 × SSC:	0,30 M NaCl + 0,030 M Natriumcitrat, pH-Wert 7
3 × SSC:	0,45 M NaCl + 0,045 M Natriumcitrat, pH-Wert 7
5 × SSC:	0,75 M NaCl + 0,075 M Natriumcitrat, pH-Wert 7
6 × SSC:	0,90 M NaCl + 0,090 M Natriumcitrat, pH-Wert 7
FDSS:	50 % entionisiertes Formamid + 5 × Denhardt's + 5 × SSPE + 0,1 % SDS + 100 µg/ml denaturierte Kalbs-Thymus-DNA
SSPE:	0,15 M NaCl + 10 mM NaH ₂ PO ₄ + 1 mM EDTA, pH-Wert 7,4
SM:	Phagenspeichermedium, das 5,8 g NaCl, 2 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O, 50 ml 1 M Tris-Cl (pH-Wert 7,5) und 5 ml 2%ige Gelatine pro Liter enthält.
NZ-Nährlösung:	Medium, das 10 g NZ-Amin, 5 g NaCl und 2 g MgSO ₄ · 7 H ₂ O enthält (NZ-Amin ist ein Typ-A-Hydrolysat von Casein, hergestellt und vertrieben von Humko Sheffield Chemical Division of Kraft, Inc. USA)
IPTG:	Isopropylthiogalactosid
x-gal:	5-Brom-3-chlor-3-indolylgalactosid
TAE:	0,04 M Tris-acetat (pH-Wert 8,0) — 0,002 M EDTA
5 × Denhardt's	Eine wäßrige Lösung, die Ficoll 1 000 mg, Polyvinylpyrrolidon 1 000 mg und BSA 1 000 mg pro Liter enthält
Lösung:	
BP:	Basenpaar

Bezugsbeispiel 1

Schritt 1

(Herstellung von TNF aus Kaninchenserum)

Weibliche Kaninchen mit einem Gewicht von 2,5 bis 3,0 kg erhalten eine Injektion von 50 mg mit Formalin getöteten **Propionibacterium acnes** (**Corynebacterium parvum**, Wellcome Research Laboratories, England) durch die Ohrvene. Nach acht Tagen werden 100 µg Endotoxin (Lipopolysaccharid von **Escherichia coli** 026:B6, hergestellt von Difco Laboratories, USA) gleichfalls durch die Ohrvene injiziert, und 2 Stunden später wird Vollblut aus dem Herzen entnommen. Dem gesammelten Blut wird Heparinnatrium in einer Menge von 100 Einheiten je 100 ml zugesetzt. Das Blut wurde anschließend mit 5000 U/min 30 Minuten lang unter Kühlung zentrifugiert, um Blutzellen und unlösliche Feststoffe zu entfernen. Als Ergebnis wird ein Plasma (2,4 Liter) mit einer zytotoxischen Serum-TNF Aktivität von 3×10^4 Einheiten/ml von 40 Kaninchen gewonnen.

Schritt 2

(Teilweise Reinigung von TNF aus Serum)

Zu dem in Schritt 1 gewonnenem Plasma (2,4 Liter) werden 24 g Cellit gegeben. Das resultierende Gemisch wird eine Stunde lang gerührt und danach filtriert. Das Filtrat wird mit 1,2 Litern 0,04 M Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 7,8) vermischt und danach auf eine Säule von DEAE-Sepharose CL-6B (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemicals, Inc. Schweden) aufgegeben, die ausreichend mit 0,04 M Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 7,8) äquilibriert wurde. Die Säule wird mit 0,04 M Tris-HCl-Puffer, der 0,1 M NaCl enthält, gewaschen, und der adsorbierte TNF wird unter Verwendung von 0,04 M Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 7,2) der 0,18 M NaCl enthält, eluiert. Fraktionen, die Anzeichen für zytotoxische Aktivitäten gegenüber L-Zellen zeigen, werden durch Ultrafiltration konzentriert. Das auf diese Weise gewonnene Konzentrat wird auf eine Säule von Sephacryl S-200 (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Schweden) aufgegeben, ausreichend mit 5 mM Phosphatpuffer äquilibriert und unter Verwendung des gleichen Puffers gel-filtriert. Die aktiven Fraktionen werden durch Ultrafiltration eingeeengt, wodurch ein gereinigter TNF mit einer Aktivität von $3,5 \times 10^6$ Einheiten und einer spezifischen Aktivität von 18×10^6 Einheiten/mg gewonnen wird.

Schritt 3

(Anti-TNF Antikörper)

Der teilweise in Schritt 2 gereinigte Kaninchenserum-TNF wird mit vollständigem Freund's Adjuvans (1:1) gemischt und dann subkutan in den Rücken einer 12 Wochen alten männlichen BALB/c-Maus injiziert. Der obige Vorgang wird nach 2 und 4 Wochen nach der ersten Injektion wiederholt. Eine Woche nach der letzten Injektion wird Vollblut entnommen. Aus dem entnommenen Blut wird ein Serum gewonnen.

Das auf diese Weise gewonnene Serum wird dem Kulturmedium für die Beurteilung der zytotoxischen Aktivität von TNF gegenüber L-Zellen in einer solchen Menge zugesetzt, daß es 500fach in der endgültigen Konzentration verdünnt ist. Die zytotoxische Aktivität des Kaninchen-Serum-TNF gegenüber L-Zellen wird bestimmt. Es wurde gefunden, daß der Kaninchenserum-TNF keine Zytotoxizität gegenüber L-Zellen aufweist. Aus dem obigen Ergebnis kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß das in diesem Schritt gewonnene Mäuseserum einen Antikörper gegen den Kaninchenserum-TNF (anschließend als „Anti-TNF-Antikörper“ bezeichnet) enthält.

Schritt 4

(Herstellung von TNF-erzeugenden Zellen)

Einem weiblichen Kaninchen werden intravenös mit Formalin getötete Zellen von **Propionibacterium acnes** (**Corynebacterium parvum**); Wellcome Research Laboratories, England) injiziert. Sieben Tage später wird an dem Kaninchen eine Tracheotomie vorgenommen, und die Lunge wird mit einer physiologischen Kochsalzlösung gewaschen, wodurch schwimmende Zellen gewonnen werden. Die auf diese Weise gewonnenen Zellen werden mit einer physiologischen Kochsalzlösung gewaschen. Unter Verwendung von RPMI 1640 (Flow Laboratories, Inc., USA) als Kulturmedium, das 10 V/V% fetales Kalbsserum enthält, werden die Zellen bei 37°C in 5% Kohlendioxid enthaltender Luft inkubiert. Die Zellkultur wird in zwei Gruppen geteilt, und zu einer Gruppe wird von **Escherichia coli** (Lipopolysaccharid von **Escherichia coli** 026:B6, hergestellt von Difco Laboratories, USA) gewonnenes Endotoxin in einer Konzentration von 10 µg/ml zugegeben. Die gleiche Menge steriles Wasser wird zu der anderen Gruppe gegeben. Die überstehende Flüssigkeit der Zellkultur, der Endotoxin zugesetzt worden war, zeigt zytotoxische Aktivität gegenüber L-Zellen, und die Aktivität erreicht den Höchstwert innerhalb von sieben Stunden. Diese Aktivität wird durch den Anti-TNF-Antikörper aufgelöst, jedoch nicht durch das normale Mäuseserum. Dagegen zeigt die überstehende Flüssigkeit der Zellkultur, der kein Endotoxin zugesetzt worden war, keine Zytotoxizität gegenüber L-Zellen.

Schritt 5

(Relative Molekülmasse von TNF)

Zu der in Schritt 4 hergestellten Zellkultur, die den Endotoxin-Zusatz erhalten hatte, wird außerdem radioaktives L-(³⁵S) Methionin (1300 Ci/mMol, hergestellt von Amersham Industries plc, England) gegeben (1 mCi/ml). Gemäß dem Verfahren von Laemmli (Laemmli, U. K. [1970], Nature [London], Bd. 227, S. 680–685) wird die überstehende Flüssigkeit mit Hilfe der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert. Die Gelkonzentration wird auf 12,5 Ma.-% eingestellt. Nach der Elektrophorese wird das Gel mit ENHANCE® (Warenzeichen eines Produktes von New England Nuclear Inc., USA) behandelt und nach dem Trocknen auf einem Röntgenfilm belichtet (Fuji RX, hergestellt und vertrieben von Fuji Photo Film Co. Ltd., Japan). In der überstehenden Flüssigkeit der Zellkultur mit dem Endotoxin wurde beobachtet, daß eine Substanz mit einer relativen Molekülmasse von über 17500 gebildet wurde.

Des weiteren wird die überstehende Flüssigkeit der in Schritt 4 hergestellten Zellkultur in der gleichen oben beschriebenen Weise der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterzogen. Anschließend wird das Gel in 2,5% NP40® (einem oberflächenaktiven Mittel, vertrieben von Calbiochem, USA) eine Stunde lang geschüttelt und danach zwei Stunden lang in Wasser.

Nach dem Schütteln wird jede Wanderungsbahn durch Ausschneiden abgetrennt und zu Streifen von 2 mm Breite in einer senkrecht zur Wanderungsrichtung verlaufenden Richtung geschnitten. Jeder Streifen wird mit L-Zellen kultiviert und zytotoxische Aktivität gegenüber L-Zellen beurteilt. In der Bahn, auf der die das Endotoxin enthaltende überstehende Flüssigkeit der Zellkultur entwickelt wird, wird Zytotoxizität gegenüber L-Zellen an einer Stelle beobachtet, die der relativen Molekülmasse von 17500 entspricht. An anderen Stellen ist keine Zytotoxizität zu beobachten.

Schritt 6

(Extraktion von mRNA)

Die in Schritt 4 hergestellte Zellkultur wird nach der Zugabe von Endotoxin 2 Stunden lang inkubiert, worauf Zentrifugieren zum Sammeln der Zellen folgt. Die Extraktion von zytoplasmatischer RNA aus den gesammelten Zellen und die Extraktion von mRNA von der zytoplasmatischen RNA werden nach dem Verfahren von Chirgwin, u. a., (siehe Chirgwin, J. M., u. a., Biochemistry, Bd. 18, S. 5294 [1979]) vorgenommen. 4 ml einer 4 M Guanidinthiocyanatlösung werden zu 3×10^8 Zellen gegeben, und das Gemisch wird mit Hilfe eines Homogenisators (Modell: AM-7, hergestellt und vertrieben von Nihon Seiki Seisakusho, Japan) pulverisiert. Die Rückstände werden durch Zentrifugieren entfernt, und 2,4 g Cesiumchlorid werden darin gelöst. Das Gemisch wird vorsichtig in ein Polyallomer-Röhrchen gegossen, in das zuvor 2,5 ml 5,7 M Cesiumchlorid und 0,1 M EDTA-Lösung (pH-Wert 7,5) eingefüllt worden waren, und anschließend mit 30000 U/min 12 Stunden lang bei 20°C unter Verwendung eines Beckman SW41 Rotors (hergestellt und vertrieben von Beckman Instruments, USA) ultrazentrifugiert. Nach Entfernung der überstehenden Flüssigkeit wird das Pellet in 1 ml 10 mM Tris-HCl-Puffer (der 5 mM EDTA und 1 Ma.-%/Vol.-% SDS enthält) gelöst. Die resultierende Lösung wird mit einem 4:1-Vol.-Gemisch von Chloroform und 1-Butanol extrahiert. Zu der wäßrigen Phase werden 0,05 Volumen 2 M Natriumacetat und 2,5 Volumen Ethanol gegeben, und das Ganze wird 2 Stunden lang bei –20°C oder länger stehen gelassen, um dadurch RNA auszufällen. Das Präzipitat wird durch Zentrifugieren gesammelt, getrocknet und anschließend in 500 µl sterilem Wasser gelöst. Als Ergebnis wird eine zytoplasmatische RNA-Lösung gewonnen. Die oben gewonnene RNA-Lösung wird 2 Minuten lang auf 68°C erhitzt und danach schnell abgeschreckt. 500 µl einer zweifachen Konzentration von 10 mM Tris-EDTA-Puffer (pH-Wert 7,4) (der 1 mM EDTA, 0,1 Ma.-%/Vol.-% SDS und 0,5 M Lithiumchlorid enthält) werden zu der Lösung gegeben, und das Gemisch wird auf eine 200-mg-Oligo-dT-Cellulosesäule (hergestellt und vertrieben von Bethesda Research Laboratories Inc., USA) aufgegeben und mit 10 ml des gleichen Puffers (einfache Konzentration) wie oben beschrieben gewaschen. Das von der Säule zurückgehaltene Material wird mit 2 ml eines Eluierungspuffers, der 10 mM Tris-HCl-Puffer, pH-Wert 7,4, 1 mM EDTA und 0,1 M/Vol.-% SDS enthält, eluiert. Dem Eluat werden 0,05 Volumen Natriumacetatlösung und 2,5 Volumen Ethanol zugesetzt, und die Mischung wird zur Ausfällung auf –20°C abgekühlt. Das Präzipitat wird durch Zentrifugieren gesammelt und auf die Oligo-dT-Cellulose-Säule aufgegeben, und die auf der Oligo-dT-Cellulose adsorbierten Fraktionen werden gesammelt. 85 µg mRNA werden zurückgewonnen, wie durch die Ultraviolettspektumanalyse bestimmt wurde.

Schritt 7

(Größenfraktionierung von mRNA)

880 µg mRNA, die nach dem gleichen Verfahren wie in Schritt 6 beschrieben hergestellt wurde, werden in 250 µl Wasser gelöst, und die resultierende Lösung wird auf einen 10 ml 5 bis 25% linearen Sucrose-Dichtegradienten aufgebracht. Der Sucrose-Dichtegradient wird mit Hilfe des ISCO 570 Gradienters (hergestellt und vertrieben von ISCO Inc., USA) unter Verwendung von Tris-Pufferlösung (die 25 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,2), 2 mM EDTA und 1 Ma.-%/Vol.-% SDS enthält), der 5% Sucrose bzw. 25% Sucrose enthält, hergestellt.

Mit Hilfe des Beckman SW41 Rotors wird die Ultrazentrifugierung mit 40000 U/min 12 Stunden lang bei 4°C vorgenommen, und Fraktionen von je 400 µl werden mit Hilfe eines Fraktion-Rückgewinnungsgerätes (hergestellt und vertrieben von Beckman Instruments, USA) zurückgewonnen und anschließend in Ethanol ausgefällt. Die ausgefällten Fraktionen werden zentrifugiert und in sterilem Wasser gelöst.

Schritt 8

(Versuch der Translation von mRNA)

Die Translation von mRNA unter Verwendung von Oocyten von *Xenopus laevis* (biologisches Lehrmaterial von Hamamatsu) wird nach der in den Versuchsberichten (zum Beispiel Hiroshi Teräoka, Miko Itsuki und Kentaro Tanaka, „Protein, Nucleic acid, Enzyme“ Genetic Engineering, Sonderausgabe, 1981, S. 602) beschriebenen Verfahrensweise durchgeführt. *Xenopus laevis* wird von biologischem Lehrmaterial von Hamamatsu bezogen. In Schritt 5 gewonnene fraktionierte mRNA wird in sterilem Wasser gelöst, um eine Konzentration von $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ zu erzielen, und die Lösung wird in Oocyten in einer so geringen Menge von 50 nl je Zelle injiziert. Die Zellen werden anschließend 24 Stunden lang in Barth's Lösung (die 7,5 mM Tris-HCl [pH-Wert 7,6], 88 mM NaCl, 1 mM Kaliumchlorid, 0,33 mM Calciumnitrat, 0,41 mM Calciumchlorid, 0,82 mM Magnesiumsulfat, 2,4 mM Natriumhydrogencarbonat, 18 U/ml Penicillin G und $18 \mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin enthält), die 1 mg/ml Rinderserumalbumin enthält, gezüchtet. Die Oocyten werden in der Kulturflüssigkeit mit Hilfe eines Glasstabes zerstoßen. Die Kulturflüssigkeit wird danach zentrifugiert, und die überstehende Flüssigkeit wird auf zytotoxische Aktivität gegenüber L-Zellen analysiert. mRNA wird translatiert, um ein Polypeptid zu ergeben, das Sedimente von maximaler Aktivität mit einer Größe von 16S hat. Diese Aktivität wird durch den in Schritt 3 gewonnenen Anti-TNF-Antikörper eliminiert, jedoch nicht durch das normale Mäuseserum.

Schritt 9

(Herstellung von Transformanten)

Unter Verwendung von $5 \mu\text{g}$ der in Schritt 7 gewonnenen fraktionierten mRNA wird in Übereinstimmung mit dem in Literaturangabe (1), Seite 96, beschriebenen Verfahren eine doppelsträngige DNA erzeugt. Als die Revers-Transcriptase wird ein Produkt von Life Science, Inc., USA verwendet. Die doppelsträngige DNA wird auf einem 3,5%igen Polyacrylamidgel größenfraktioniert, und es wird 330 ng Fraktion von annähernd 1000 bis 2000 BP gewonnen. Nach der in Literaturangabe (1) beschriebenen Verfahrensweise werden 7 ng dieser Fraktion mit DesoxyC-Resten unter Verwendung von Terminal-Desoxynucleotidyl-Transferase (hergestellt und vertrieben von Bethesda Research Laboratory Inc., USA) verlängert und mit 56 ng Plasmid pBR322 gegläht, das mit PstI digeriert und mit DesoxyG-Resten verlängert worden war. Das in dieser Weise geglähte Gemisch wird in den *E. coli* K-12 Stamm (HB 101, ATCC 33694) zur Transformation des Stammes eingefügt. Infolgedessen werden 12000 Transformanten gewonnen.

Schritt 10

(Partial-Aminosäure-Sequenz von Kaninchen-TNF)

Teilweise in Schritt 2 gereinigter Kaninchen-TNF (Aktivität: 5×10^7 Einheiten) wird der SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese zur Reinigung wie in Schritt 5 unterzogen. Ein Teil des Gels wird mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt. Ein Band wird an der einen relativen Molekülmasse von 17000 entsprechenden Stelle aus dem Gel ausgeschnitten und mit 1%igem Ammoniumhydrogencarbonat extrahiert. Etwa $180 \mu\text{g}$ TNF werden als Eiweiß gewonnen.

$150 \mu\text{g}$ des zurückgewonnenen TNF werden in $75 \mu\text{l}$ 1%igem Ammoniumhydrogencarbonat gelöst, worauf die Zugabe von $3 \mu\text{g}$ TPCK Trypsin (hergestellt und vertrieben von Worthington Biochemical, USA) folgt. Das Gemisch wird 4 Stunden lang bei 37°C inkubiert. Das Gemisch wird anschließend mit Hilfe einer Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographiesäule, die Cosmosil 5C8 (hergestellt und vertrieben von Nakarai Chemical, Ltd.) als Füllmaterial enthält, fraktioniert, um dadurch mit Trypsin digerierte Fragmente zu gewinnen.

Der stark gereinigte TNF und die trypsin-digerten Fragmente werden danach mit Hilfe einer Sephadex G-25 Säule entsalzt und anschließend gefriergetrocknet. Nach der Methode von R. M. Hewick, u. a. (siehe J. Biol. Chem., Bd. 256, S. 7990–7997, 1981) werden gereinigter TNF und trypsin-digierte Fragmente jeweils der Edman-Degradation vom N-Terminus unterzogen. In jedem Schritt freigesetzte PTH-Aminosäure wird nach dem herkömmlichen Verfahren mit Hilfe eines Hochleistungs-Chromatographie-Modells SP8100 (hergestellt und vertrieben von Spectra Physics, USA) unter Verwendung von Solpacks ODS (hergestellt und vertrieben von E. I. Du Pont, USA) als Säule analysiert. Als Ergebnis wird gefunden, daß TNF die folgende N-Terminus-Aminosäuresequenz besitzt: Ser-Ala-Ser-Arg-Ala-Leu-Ser-Asp-Lys-Pro-Leu-Ala-His-Val-Val-Ala-Asn-Pro-Gln-Val-Glu-Gly-Gln-Leu-Gln-

Eines der trypsin-digerten Fragmente hat die folgende N-Terminus-Aminosäuresequenz: Glu Thr Pro Glu Glu Ala Glu Pro Met Ala

Schritt 11

(Synthese von Oligodesoxynucleotid-Sonde)

Oligodesoxynucleotide, die zu der Basensequenz von mRNA komplementär sind, die von der in Schritt 10 gewonnenen Aminosäuresequenz von Kaninchen-TNF abgeleitet wurde, werden nach dem verbesserten Phosphotriester-Verfahren synthetisiert, über das der Erfinder bereits in H. Ito, u. a., „Nucleic Acid Res.“, **10**, 1755–1769 (1982) berichtet hat. Bei der Herstellung von Oligodesoxynucleotiden werden 128 von der Aminosäuresequenz von Kaninchen-TNF berechnete Oligodesoxynucleotide in fünf Gruppen eingeteilt, und zwar in Gruppen von 16, 16, 32, 32 und 32, und werden als Mischungen von Oligodesoxynucleotiden der jeweiligen Gruppen synthetisiert. Von den gewonnenen Oligodesoxynucleotiden der jeweiligen Gruppen wird die Schutzgruppe nach dem herkömmlichen Verfahren entfernt, und sie werden mit Hilfe von Säulenchromatographie unter Verwendung von Sephadex G-50 (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Schweden), Elektrophorese auf einem 20 Ma.-% Polyacrylamidgel, das 7 M Harnstoff enthält, und Säulenchromatographie unter Verwendung von DE52 (hergestellt und vertrieben von Whatman Ltd., USA) gereinigt. Die auf diese Weise gewonnenen Oligodesoxynucleotide der jeweiligen Gruppe werden gegen 0,1 mM Tris-EDTA-Pufferlösung dialysiert.

Jedes der gereinigten Oligodesoxynucleotide der entsprechenden Gruppe wird unter Verwendung von T_4 Polyphosphat-Kinase (hergestellt und vertrieben von Bethesda Research Laboratories, Inc., USA) und 32-P-Adenosintriphosphat nach dem herkömmlichen Verfahren markiert und anschließend durch Säulenchromatographie unter Verwendung von DE52 (hergestellt und vertrieben von Whatman Ltd., USA) gereinigt. Das radioaktive Material wird in einer Menge von etwa 3×10^8 cpm μg in jedes der Oligodesoxynucleotide der entsprechenden Gruppe eingebaut. Die in Form einer Mischung der jeweiligen Gruppe gewonnenen Oligodesoxynucleotid-Sonden werden wie in Tabelle 1 gekennzeichnet.

Ein Teil der Aminosäuresequenz von Kaninchen-TNF, der Basensequenz von mRNA, berechnet aus der Aminosäuresequenz von Kaninchen-TNF, und der Basensequenzen von synthetischen Oligodesoxynucleotid-Sonden der jeweiligen Gruppen werden in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1

Aminosäure- sequenz	Carboxyl terminal...	Ala	Met	Pro	Glu	Ala	Glu	Glu...	Amino terminal
mRNA	3'.....	XCG	GTA	XCC	YAG	XCG	YAG	YAG.....	5'
Sonde MH	5'	GC	CAT	MGG	MTC	GGC	MTC	MTC	3'
Sonde MI	5'	GC	CAT	NGG	MTC	GGC	MTC	MTC	3'
Sonde MJ	5'	GC	CAT	ZGG	MTC	AGC	MTC	MTC	3'
Sonde MK	5'	GC	CAT	ZGG	MTC	CGC	MTC	MTC	3'
Sonde ML	5'	GC	CAT	ZGG	MTC	TGC	MTC	MTC	3'

Anmerkung:

X stellt einen Ribonucleinsäurerest von A, C, G oder U dar.

Y stellt einen Ribonucleinsäurerest von A oder G dar.

M stellt einen Desoxyribonucleinsäurerest von T oder C dar.

N stellt einen Desoxyribonucleinsäurerest von A oder G dar.

Z stellt einen Desoxyribonucleinsäurerest von A, C, G oder T dar.

Schritt 12

Untersuchung von Oligodesoxynucleotid)

Die nach Schritt 6 gewonnene mRNA der TNF erzeugenden Zellen wird mit einer 1 M Glyoxal, 10 mM NaH₂PO₄ und 50 Vol.-% Dimethylsulfoxid enthaltenden Lösung 60 Minuten lang bei 50°C behandelt und anschließend unter Anwendung von Elektrophorese auf einem 1,1 Ma.-% Agarosegel fraktioniert. Die fraktionierte mRNA wird nach den Hinweisen des Herstellers auf ein Filter eines Transfer-Tüpfel-Gerätes vom Elektrophorese-Typ (hergestellt und vertrieben von Bio-Rad, USA) übertragen. Danach wird die mRNA auf dem Filter des Gerätes mit einer 5 × Denhardt's-Lösung, die eine 5 × SSC-Lösung und 150 µg/ml denaturierte Lachs-Spermatozoen-DNA enthält, 2 Stunden lang bei 65°C behandelt, und anschließend mit einer 5 × Denhardt's-Lösung, die 1 × 10⁷ cpm/ml der markierten Oligodesoxynucleotide und eine 5 × SSC-Lösung enthält, 2 Stunden lang bei 50°C behandelt. Das oben gewonnene Filter wird mit einer 6 × SSC Lösung viermal nacheinander bei Raumtemperatur, 40°C, 50°C und 60°C gewaschen. Ein XAR-5 Röntgenfilm (hergestellt und vertrieben von Eastman Kodak Company, USA) wird mit der Strahlung von dem Filter belichtet. Dadurch wird festgestellt, daß die durch Sonde MJ bezeichneten Oligodesoxynucleotide mit der mRNA am stärksten hybridisiert werden, woraus sich ergibt, daß das Oligodesoxynucleotid mit einer Basensequenz, die der mRNA vollkommen komplementär ist, in den durch Sonde MJ bezeichneten Oligodesoxynucleotiden vorhanden ist.

Schritt 13

(Klonen von TNF-Gen)

Nach der in Literaturangabe (2), Seite 162, beschriebenen Verfahrensweise werden die in Schritt 9 erhaltenen Transformanten auf ein Zellulosefilter übertragen, und die DNA der Transformanten wird mit dem in Schritt 12 ausgewählten markierten Oligodesoxynucleotid (Sonde MJ) unter den gleichen Bedingungen wie in Schritt 12 hybridisiert (Koloniehybridisierung). Bei der obigen Verfahrensweise werden 49 Kolonien, die mit den markierten Oligodesoxynucleotiden (Sonde MJ) stark hybridisiert wurden, ausgewählt und weiter auf einem anderen Nitrocellulosefilter untergebracht. Danach wird unter Verwendung von 49 Kolonien weitere Hybridisierung vorgenommen, um neun Kolonien auszuwählen, die mit den markierten Oligodesoxynucleotiden (Sonde MJ) stärker hybridisiert sind.

Nach dem in der Literaturangabe (1), Seite 6, beschriebenen Schnell-Plasmid-Trennverfahren werden etwa 5 µg Plasmid von jeder der neun Kolonien gewonnen. Jedes der gewonnenen Plasmide wird unter Verwendung von Restriktionsenzymen **Pst**I, **Taq**I, **Rsa**I und **Pvu**II (jeweils hergestellt und vertrieben von Bethesda Research Laboratories, Inc., USA) nach der im Handbuch des Herstellers beschriebenen Verfahrensweise gespalten, worauf Elektrophorese auf einem 1 Ma.-% Agarosegel folgt. Dann werden die durch Spaltung durch die entsprechenden Restriktionsenzyme gewonnenen Fragmente hinsichtlich ihrer Länge verglichen.

Die Ergebnisse führen zu der Schlußfolgerung, daß alle den neun Kolonien entsprechenden neun Stämme die Basensequenz des durch Spaltung durch **Pvu**II und **Rsa**I gewonnenen und aus etwa 50 BP bestehenden Fragments haben und daß die meisten der neun Stämme die Basensequenz des durch Spaltung durch **Rsa**I gewonnenen und aus etwa 200 BP bestehenden Fragments besitzen. Mit anderen Worten, die Ergebnisse besagen, daß die neun Stämme teilweise gemeinsam Basensequenzen besitzen. Die Ergebnisse der Analyse mit Hilfe der Restriktionsenzyme sind die Fig. 1 wiedergegeben.

Sieben Stämme, die in der folgenden Tabelle 2 bezeichnete Plasmide enthalten, werden getrennt in 2 ml LB-Medium, das 10 µg/ml Tetracyclin enthält, gezüchtet, bis die optische Dichte der Lösungen die in der folgenden Tabelle 2 angeführten Werte zeigt, worauf Zentrifugieren zur Gewinnung entsprechender Stämme folgt. Jeder der gewonnenen Stämme wird einzeln in 2 ml physiologische Kochsalzlösung gegeben und durch Beschallung zerrissen. Die gewonnenen Lösungen werden zentrifugiert, und die zytotoxische Aktivität gegenüber L-Zellen der gewonnenen überstehenden Flüssigkeit wird bestimmt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 2 enthalten. Als Blindversuch werden die gleichen oben erläuterten Vorgänge unter Verwendung eines Plasmid pBR322 enthaltenden Stammes wiederholt. Die Ergebnisse enthält die folgende Tabelle 2.

Tabelle 2

Plasmid	Anzahl von geglühten Basenpaaren	OD ₆₀₀	Zytotoxische Aktivität gegen L-Zellen (Einheit/ml)
pB 2-2	1 400	1,369	35
pB 2-3	800	1,605	< 10
pB 2-7	1 060	1,364	< 10
pR 9	1 550	1,618	< 10
pR 12	1 400	1,458	15
pR 18	1 850	1,438	< 10
pR 25	1 350	1,514	< 10
pBR322	0	1,677	< 10

Die zytotoxische Aktivität gegenüber L-Zellen wird durch Anti-TNF-Antikörper eliminiert, aber nicht durch normales Mäuseserum. Daraus geht hervor, daß alle oben genannten neun Kolonien Plasmide haben, die für TNF kodierende Oligodesoxynucleotide enthalten.

Schritt 14

(Bestimmung der Basensequenz von für Kaninchen-TNF kodierender DNA)

E. coli Stämme, die die Plasmide pB2-7 und pR 18 enthalten, werden in einem Liter M9-Medium gezüchtet, das in Literaturangabe (3), Seite 440, beschrieben wird und 10 µg/ml Tetracyclin enthält. Anschließend wird nach der in Literaturangabe (3), Seite 90, beschriebenen Verfahrensweise jedes der Plasmide in einer Menge von etwa 150 µg isoliert.

Die Basensequenz des Inserts jedes Plasmids wird nach dem chemischen Verfahren von Maxam-Gilbert, beschrieben in Maxam, u. a., „Method in Enzymology“, 55, S. 490 (1980), Academic Press, bestimmt. Von der auf diese Weise bestimmten Basensequenz wurde ermittelt, daß sie mit den in Schritt 9 bestimmten Partial-Aminosäuresequenzen übereinstimmt. Somit ist anzunehmen, daß die gesamte Sequenz von TNF ermittelt ist.

Schritt 15

In diesem Schritt wird die Konstruktion eines Plasmids unter Verwendung des Rekombinatplasmids pR 12 ausgeführt, um die direkte Expression von TNF in *E. coli* unter Verwendung von *lac* als Promotor zu erzielen. Die Verfahren werden schematisch in Fig. 2 gezeigt. Zunächst werden 10 µg Plasmid pR 12 mit 10 Einheiten *Apal* (hergestellt und vertrieben von Bethesda Research Laboratories, Inc., USA) zwei Stunden lang bei 37°C digeriert und auf einem 4 Ma.-% Polyacrylamidgel elektrophoresiert, um 630 BP-Fragmente zu isolieren. Annähernd 1 µg des Fragmentes werden durch Elektroelution von dem Gel isoliert. In der gleichen Weise wie in Schritt 10 werden zwei in Fig. 2 gezeigte Oligodesoxynucleotide, und zwar 5'-GATCCATGTCAGCTTCTCGGGCC-3' und 5'-CGAGAAGCTGACATG-3', synthetisiert. Anschließend wird jedes 5'-Ende der Oligodesoxynucleotide (etwa 100 pMol) unter Verwendung von T₄-Polynucleotidkinase nach dem in Literaturangabe (3), Seite 122, beschriebenen Verfahren phosphoryliert. Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsgemisch mit Phenol und anschließend mit Chloroform extrahiert. Danach werden die gewonnenen synthetischen Oligomere mit 0,5 µg des *Apal* 630 BP-Fragmentes vermischt und mit Ethanol ausgefällt.

Das Fragment wird nach der in Literaturangabe (1), Seite 37, beschriebenen Verfahrensweise mit den synthetischen Oligomeren über Nacht bei 4°C unter Verwendung von 10 Einheiten T₄-DNA-Ligase ligiert. Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsgemisch mit Ethanol ausgefällt und mit 20 Einheiten *Bam*HI drei Stunden lang bei 37°C digeriert, worauf Elektrophorese auf einem 4 Ma.-% Polyacrylamidgel zur Gewinnung eines etwa 670 BP Fragmentes durch Elektroelution folgt. 1 µg handelsübliches Plasmid pUC-8 (Katalog-Nr. 4916, hergestellt und vertrieben von P-L-Biochemicals, Inc., USA) wird mit *Bam*HI digeriert und mit Phenol und anschließend mit Chloroform extrahiert, worauf Ethanolpräzipitation zur Gewinnung eines Vektors folgt. 0,5 µg des gewonnenen Vektors werden mit dem oben gewonnenen Fragment, das *Bam*HI Stellen an seinen beiden Enden besitzt und etwa 670 für TNF kodierende BP enthält, unter Verwendung von T₄-DNA-Ligase ligiert. Gemäß dem in der Literaturangabe (4), Seite 20, beschriebenen Verfahren wird *E. coli* unter Verwendung des oben gewonnenen Vektors transformiert und auf einem Agarmedium, das 1 mM IPTG und 0,004% (M/V) X-gal enthält, gezüchtet, um etwa 200 weiße Kolonien zu erhalten. Plasmid-DNA wird aus 100 dieser Transformanten hergestellt und mit *Bam*HI digeriert. Als Ergebnis wird festgestellt, daß 15 Plasmide das vorgesehene *Bam*HI-Fragment (etwa 670 BP) enthalten. Zur Untersuchung der Einfügerungsrichtung werden die obigen 15 Plasmide mit *Eco*RI, das nur eine Erkennungsstelle an seinem pUC-8 hat, und *Pvu*II, das nur eine Erkennungsstelle an seinem etwa 670-Basenpaar-Fragmentteil hat, digeriert und auf einem 6 Ma.-% Polyacrylamidgel elektrophoresiert. Als Ergebnis wurde ermittelt, daß 7 Plasmide das aus etwa 140 BP bestehende beabsichtigte Fragment haben und daß die Transkriptionsrichtung des *lac*-Promotors an pUC-8 mit der der für TNF kodierenden Oligodesoxynucleotide übereinstimmt.

Die DNA-Sequenzanalyse zeigt, daß diese sieben Plasmide die gleiche Sequenz haben sowie die erwünschte Nucleotidsequenz an den Verbindungsstellen zwischen dem *lac*-Promotor, synthetischer DNA und cDNA.

Schritt 16

Die Konstruktion weiterer Plasmide wird unter Verwendung des Plasmids pR 17, um die direkte Expression von TNF in *E. coli* zu erzielen, unter Einsatz von *lac* UV5 als Promotor ausgeführt. Die Verfahren sind schematisch in Fig. 3 gezeigt. Zunächst werden 10 µg des Plasmids pR 17 mit 10 Einheiten *Apal* (hergestellt und vertrieben von Bethesda Research Laboratories, Inc., USA) zwei Stunden lang bei 37°C digeriert und auf einem 4 Ma.-% Polyacrylamidgel elektrophoresiert, um ein aus etwa 630 BP bestehendes Fragment zu isolieren. Etwa 1 µg des Fragmentes wird von dem Gel durch Elektroelution isoliert. In der gleichen Weise wie in Schritt 10 werden zwei in Fig. 3 gezeigte Oligodesoxynucleotide, und zwar 5'-AATTCATGTCAGCTTCTCGGGCC-3' und 5'-CGAGAAGCTGACATG-3' synthetisiert. Danach wird in Übereinstimmung mit dem in Literaturangabe (3), Seite 122, beschriebenen Verfahren jedes 5'-Ende der beiden Oligodesoxynucleotide (etwa 100 pMol) unter Verwendung von T₄-Polynucleotidkinase phosphoryliert. Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsgemisch mit Phenol und anschließend

mit Chloroform extrahiert. Danach werden die synthetischen Oligomere mit 0,5 µg des zuvor gewonnenen Apal-Fragmentes (etwa 630 BP), das von dem Plasmid pR 17 hergestellt wurde, vermischt und mit Ethanol ausgefällt. Das Fragment wird mit den synthetischen Oligomeren über Nacht bei 4°C unter Verwendung von 10 Einheiten T₄-Ligase nach dem in Literaturangabe (1), Seite 37, beschriebenen Verfahren ligiert. Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsgemisch mit Ethanol ausgefällt und mit 20 Einheiten EcoRI drei Stunden lang bei 37°C digeriert und anschließend der Elektrophorese auf einem 4Ma.-% Polyacrylamidgel unterzogen, um ein Fragment (etwa 670 BP) durch Elektroelution zu gewinnen. In Übereinstimmung mit der von F. Fuller, „Gene“, 19, S. 42–54 (1982) beschriebenen Verfahrensweise wird Plasmid pOP95-15 hergestellt.

1 µg pOP95-15 wird mit EcoRI digeriert und mit Phenol und anschließend mit Chloroform extrahiert, worauf Ethanolpräzipitation zur Gewinnung eines Vektors folgt. Unter Verwendung von T₄-Ligase werden 0,5 µg des gewonnenen Vektors mit dem Fragment von (etwa 670 BP) ligiert, das durch Ligation des synthetischen Oligonucleotids mit dem für TNF kodierenden Oligonucleotid gewonnen wurde. In Übereinstimmung mit der in Literaturangabe (4), Seite 20, beschriebenen Verfahrensweise wird E. coli JM 101 (ATCC 33876) unter Verwendung oben gewonnenen Vektors transformiert und auf einem 1 mM IPTG und 0,004% (M/V)-X-gal enthaltenden Medium gezüchtet, um etwa 150 weiße Kolonien zu erhalten.

Plasmid-DNA wird aus 100 dieser Kolonien hergestellt und mit EcoRI digeriert. Als Ergebnis wird gefunden, daß 12 Plasmide das verlangte EcoRI-Fragment (etwa 670 BP) enthielten. Zur Untersuchung der Einfüguungsrichtung werden die obigen 12 Plasmide mit PvuII und PstI digeriert und auf einem 1,5Ma.-% Agarosegel elektrophoresiert. Dadurch wurde ermittelt, daß vier Plasmide die verlangten Fragmente (etwa 1280 BP und etwa 2600 BP) haben und daß die Transcriptionsrichtung des lac UV5-Promotors mit der der für TNF kodierenden Oligodesoxynucleotide übereinstimmt.

Die Basensequenzanalyse zeigt, daß diese vier Plasmide die gleiche Sequenz haben und daß der lac UV5-Promotor, das synthetische Oligodesoxynucleotid und cDNA einwandfrei miteinander kombiniert sind. Die gewonnenen Plasmide werden als pTNF-lacUV5-1 bezeichnet.

Schritt 17

(Reinigung von durch E. coli erzeugtem TNF)

E. coli Stämme, die in Schritt 16 gewonnene Plasmide enthalten, werden in 50 ml Ampicillin enthaltendem LB-Medium über Nacht gezüchtet. Danach werden die Stämme in 5 Liter, 100 µg/ml Ampicillin enthaltendes LB-Medium übertragen und weitere drei Stunden lang bei 37°C gezüchtet. Bis zu einer endgültigen Konzentration von 1 mM wird Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (hergestellt und vertrieben von Sigma Chemical Company, Inc., USA) zugesetzt. Die weitere Züchtung erfolgt 6 Stunden lang, worauf Kühlen folgt. Danach werden Stämme durch Zentrifugieren gesammelt. In der gleichen wie in Schritt 13 beschriebenen Weise werden die Stämme in 5 Liter 0,04 M Tris-HCl-Pufferlösung (pH-Wert 7,8) gegeben und durch Beschallung zerteilt, um eine Stamm-Eiweißlösung zu erhalten. Die gewonnene Lösung besitzt eine zytotoxische Aktivität gegenüber L-Zellen von 5×10^7 Einheiten/Liter.

Die gewonnene Lösung wird in der gleichen Weise wie in Schritt 2 gereinigt, um $1,2 \times 10^6$ Einheiten TNF zu gewinnen. Die spezifische Aktivität von TNF beträgt $6,8 \times 10^7$ Einheiten/mg.

Schritt 18

(Bewertung unter Verwendung von transplantiertem Meth A Sarcom bei Mäusen)

Eine in Schritt 17 gewonnene Probe (0,2 ml) von TNF wird mit Hilfe der oben beschriebenen in-vivo-Analysemethode beurteilt. Außerdem werden 20 Tage nach der Injektion der Probe Untersuchungen über die Rückbildung von Tumoren vorgenommen, und die Heilungsrate wird nach folgender Gleichung bestimmt:

$$\text{Heilungsrate} = \frac{\text{Anzahl der Mäuse, die vollständig vom Tumor geheilt waren}}{\text{Anzahl der für den Test eingesetzten Mäuse}}$$

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3 enthalten.

Tabelle 3

Injizierte Menge von durch E. coli erzeugtem Kaninchen-TNF Einheiten/Maus	Anzahl der für den Test eingesetzten Mäuse	Bewertung der Aktivität von Proben (nach 1 Tag)	Heilungsrate (nach 20 T.)
		- + ++ +++	
2×10^5	5	0 0 1 4	5/5
Bezug (physiologische Kochsalzlösung)	5	5 0 0 0	0/5

Bezugsbeispiel 2

Schritt 1

(Transformatin von E. coli K 12 Stamm MC 1061 mit pR 18, pB2-7 und pB2-2 Plasmiden)

Kolonien von E. coli K 12 Stamm MC 1016 werden mit jedem der Plasmide pR 18, pB2-7 und pB2-2, die in Bezugsbeispiel 1 gewonnen wurden, nach herkömmlichen Verfahren transformiert. Spezielle Kolonien von E. coli K 12 Stamm MC 1061 werden in LB-Medium gezüchtet, bis die optische Dichte der Kulturlösung 0,3 bei 550 nm erreicht hat. 50 ml der gezüchteten E. coli Kultur werden geerntet, mit einem 10 mM MOPS (pH-Wert 7,0) und 10 mM RbCl enthaltenden 25-ml-Gemisch gewaschen und in einem 0,1 M MOPS (pH-Wert 6,5), 50 mM CaCl₂ und 10 mM RbCl enthaltenden 25-ml-Gemisch resuspendiert. Die resultierende Suspension wird 30 Minuten lang auf Eis gekühlt, zentrifugiert und in einem 2-ml-Gemisch des oben genannten Gemischs, das 0,1 M MOPS (pH-Wert 6,5), 50 mM CaCl₂ und 10 mM RbCl enthält, und 20 µl DMSO suspendiert. Zu einer 200-µl-Aliquote der resultierenden Suspension werden getrennt 10 µl von jeder der Plasmid-DNA-Lösungen gegeben. Jedes der resultierenden Gemische wird 30 Minuten lang auf Eis gekühlt und anschließend 60 Sekunden lang einem Wärmeschok von 44°C ausgesetzt. Unmittelbar darauf werden 5 ml des auf 37°C vorgewärmten LB-Mediums zu jedem der erwärmten Gemische gegeben, worauf

eine einstündige Inkubation bei 37°C folgt. Die gewonnenen Kulturlösungen werden jeweils zentrifugiert, um Zellpellets zu bilden. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen, und es wird LB-Medium zugesetzt und gerührt, um jedes der Zellpellets wieder zu suspendieren. Jede der resultierenden Suspensionen wird auf eine LB-Agarplatte, die 30 µg/ml Tetracyclin enthält, aufgeimpft, worauf Inkubation bei 37°C über Nacht folgt. Als Ergebnis werden Kolonien von tetracyclinresistenten Transformanten gewonnen, die jeweils mit pR 18, pB2-7 und pB2-2 Plasmiden transformiert worden waren.

Schritt 2

(Herstellung von pB2-7 und pR 18 Plasmid-DNAs)

Jeder der in Schritt 1 gewonnenen und jeweils mit pB2-7 und pR 18 Plasmiden transformierten Transformanten wird herangezogen zu (1) Vermehrung des Transformanten und Verstärkung des Plasmids; (2) Ernte und Lysis des Transformanten; und (3) Reinigung der Plasmid-DNA, in Übereinstimmung mit den Verfahren, die auf Seite 88 bis 96 von T. Maniatis, E. F. Fritsch und J. Sambrook in „Molecular Cloning“, veröffentlicht von Cold Spring Harbor Laboratory, USA beschrieben werden. Jeder der Transformanten wird in LB-Medium eingeimpft, das 30 µg/ml Tetracyclin enthält, und unter kräftigem Schütteln bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt wird wiederholt, um die Vermehrung des Transformanten und die Verstärkung des Plasmids zu erzielen. Die Transformantkultur wird durch Zentrifugieren mit 4 000 g über einen Zeitraum von 10 Minuten bei 4°C geerntet. Die überstehende Flüssigkeit wird verworfen. Das resultierende Pellet wird in 100 ml eiskalter STE (0,1 M NaCl, 10 mM Tris.Cl [pH-Wert 7,8] und 1 mM EDTA) gewaschen und durch Kochen in einer Lösung von 20 mg/ml Lysozym in 10 mM Tris.Cl, pH-Wert 8,0, lysiert. Das viskose Produkt wird in ein Ultrazentrifugenröhrchen übertragen und mit 25000 U/min 30 Minuten lang bei 4°C zentrifugiert, um eine DNA-Lösung zu gewinnen. Das Volumen der DNA-Lösung wird gemessen. Zu jedem Milliliter wird genau 1 g festes Cesiumchlorid gegeben, und es wird vorsichtig gemischt, bis das gesamte Salz gelöst ist. Zu je 10 ml Cesiumchloridlösung werden 0,8 ml einer Lösung von Ethidiumbromid (10 mg/ml in H₂O) gegeben. Die endgültige Dichte der Lösung beträgt 1,55 g/ml. Die Cesiumchloridlösung wird in ein für das Zentrifugieren geeignetes Röhrchen übertragen, und das übrige Röhrchen wird mit Leichtparaffinöl aufgefüllt. Das Zentrifugieren erfolgt mit 45000 U/min 36 Stunden lang bei 20°C, um zwei Bänder von DNA zu gewinnen, wobei das obere Band davon aus linearer Bakterien-DNA und eingekerbter kreisförmiger Plasmid-DNA und das untere Band davon aus geschlossener kreisförmiger Plasmid-DNA besteht. Das untere Band von DNA wird durch eine subkutane, in der Seite des Röhrchens eingeführte Nadel in ein Glasröhrchen übertragen. Das Ethidiumbromid wird entfernt, und die wäßrige Phase wird gegen TE-Puffer dialysiert. Die Plasmid-DNA-Lösung wird mit RNase behandelt und mit einem gleichen Volumen von äquilibriertem Phenol extrahiert. Die wäßrige Phase wird auf eine in TAE (pH-Wert 8,0) und 0,1 % SDS äquilibrierte Säure von Bio-Gel A-150 aufgegeben. Die DNA in der Säule wird gewaschen, und ein Behälter von TE mit 0,1 % SDS wird zum Sammeln von Fraktionen angebracht. Die Fraktionen werden mit Ethanol ausgefällt, um eine reine Plasmid-DNA zu gewinnen.

Durch Ausführung der obigen Verfahren werden 250 µg reine pB2-7-Plasmid-DNA und 134 µg reine pR 18-Plasmid-DNA gewonnen.

Schritt 3

(Einkerb-Translation von reinen pB2-7- und pR 18-Plasmid-DNAs)

Von der reinen, in Schritt 2 gewonnenen pB2-7-Plasmid-DNA werden 40 µg genommen, mit **Pst**I-Restriktionsenzym digeriert und der Elektrophorese durch ein 4%iges Acrylamidgel unterzogen. Nach der Elektrophorese wird die DNA gefärbt, und das erwünschte Band wird ausgeschnitten, um einen **Pst**I-Insert zu isolieren.

Unter Verwendung von 500 ng des isolierten **Pst**I-Inserts wird die Einkerb-Translation in der Weise nach Maniatis, T., u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **72**, 1184 (1975) ausgeführt. Für die Einkerb-Translation wird das von Bethesda Research Laboratories Inc. USA erzeugte und vertriebene Nick Translation Kit verwendet, und 80 pMol radioaktives dCTP werden in ein 25-µl Reaktionssystem (mit 400 Ci/mMol) gegeben. Zu einer Mischung, bestehend aus:

- 2,5 µl Lösung A (dNTP's Lösung)
- 2,5 µl Lösung B (500 ng Test-DNA, nämlich **Pst**I-Insert)
- 5 µl heißem dCTP (3200 Ci/mMol)
- 1,3 µl kaltem dCTP (65 pMol, 50 pMol/µl dCTP)
- 11,2 µl Lösung E (H₂O)

22,5 µl (insgesamt)

werden 2,5 µl Lösung C (DNase, DNA Polymerase I) gegeben, und die Umsetzung wird 60 Minuten lang bei 15°C vorgenommen. Dann wird Lösung D (Stopp-Puffer) zu dem resultierenden Gemisch gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Weiterhin wird Träger-TRNA zugesetzt, zweimalige Präzipitation in Ethanol vorgenommen und in 500 µl Wasser gelöst. Die spezifische Aktivität je µg DNA beträgt $9,3 \times 10^7$ cpm.

Mit der reinen, in Schritt 2 gewonnenen pR 18-Plasmid-DNA werden gleichfalls die oben beschriebenen Verfahren zur Einkerb-Translation ausgeführt. Die spezifische Aktivität je µg DNA beträgt 7×10^7 cpm.

Schritt 4

(Herstellung von **Rsa**I-Insert-Fragment von pR 18-Plasmid-DNA)

80 µg der pR 18-Plasmid-DNA werden mit **Rsa**I Restriktionsenzym digeriert und der Elektrophorese durch ein 4%iges Polyacrylamidgel unterzogen. Die folgenden verlangten Bänder von Inserts werden ausgeschnitten und mit Hilfe der BND-Säule gereinigt:

- etwa 640 BP 3,77 µg (Rückgewinnung 52%)
- etwa 175 BP 1,77 µg (Rückgewinnung 50%)

Der obige etwa 640-BP-Insert wird als 3'-Fragment von pR 18 bezeichnet (das bedeutet 3'-untranslatierte Region von pR 18) und der obige etwa 175-BP-Insert wird als pR 18-cfr bezeichnet (das bedeutet Kodierungsregion von pR 18).

Weiterhin werden die obigen Verfahren unter Verwendung von **Pst**I und **Mst**II Restriktionsenzymen anstelle von **Rsa**I Restriktionsenzym wiederholt, um folgendes Band zu gewinnen:

- etwa 450 BP 3,65 µg (Rückgewinnung 60%)
- Der obige Insert wird als 5'-Fragment von pR 18 bezeichnet.

Schritt 5

(Isolierung des Human-Genom-TNF-Gens)

Der in Schritt 3 von Bezugsbeispiel 1 gewonnene ^{32}P -markierte Plasmid pB2-7-Insert wird als Hybridisierungssonde zum Screenen von 10^6 -Plaques der Bakteriophage Charon 4A/Human-Genom-Sammlung verwendet, hergestellt durch Insertion in die Charon 4A EcoRI-Ligationsstelle (Blattner, u. a., „Science“ **196**, 161 [1977]) größtenbestimmter Fragmente von teilweise digerierter Human-DNA (Maniatis, u. a., „Cell“ **15**, 687 [1978]). Es wird das Plaque-Hybridisierungsverfahren von Benton und Davis (Benton und Davis, „Science“, **196**, 180 [1977]) angewandt. Da nicht alle Bakteriophagen in der Ausgangskultur das erforderliche genetische Material zur Herstellung von Human-TNF besitzen, wird eine Sonde verwendet, die eine mit dem Kaninchen-TNF-Gen komplementäre Basensequenz besitzt. DNA von Phagenplaques mit dem erforderlichen genetischen Material erhielten die radioaktive Sonde und wurden anhand ihrer Radioaktivität identifiziert. Neun Hybridisierungsplaques wurden aus der Sammlung isoliert.

Die Verfahren und Bedingungen sind wie folgt

- 1) Anzahl von Plaques:
~ 1×10^6 Plaques (~ 4×10^4 Plaques/Ø 150 mm Platte $\times$ 25)
- 2) Übertragung auf Nitrocellulosefilter:
(siehe Benton und Davis, Science, **196**, 180 [1977])
- 3) Hybridisierung:
Zugabe von $1,25 \times 10^5$ cpm/ml pB2-7-Insert-Sonde, hergestellt in Schritt 3 von Bezugsbeispiel 2, 42°C , $19\frac{1}{2}$ h
- 4) Waschen:
2 $\times$ SSC — 0,1% bei Raumtemperatur,
Eintauchzeit $\downarrow$ 10 min $\times$ 4
1 $\times$ SSC — 0,1% SDS bei 50°C
Eintauchzeit 30 min $\times$ 2
- 5) Belichtung:
XAR-5 (Eastman Kodak Company, USA)
— 80°C , 2 Verstärkerfolien, 39 h

Bei dem obigen Screenen werden 12 in Frage kommende Stämme gewonnen. In der gleichen oben erläuterten Weise wird ein zweites Screenen zur Gewinnung von neun Stämmen ausgeführt, die das vorgesehene Fragment enthalten. Unter Anwendung dieser Stämme wird ein drittes Screenen in der gleichen oben erwähnten Weise ausgeführt, um neun Stämme zu erhalten, die das vorgesehene Fragment enthalten. Unter Anwendung der gewonnenen Stämme wird ein viertes Screenen vorgenommen, um zu bestätigen, daß die neun Stämme das vorgesehene Fragment enthalten. Die neun, das vorgesehene Fragment enthaltenden Bakteriophagen werden als HG-1 bis HG-9 bezeichnet.

Schritt 6

(Isolierung von Kaninchen-Genom-TNF-Gen)

Das in Schritt 5 von Bezugsbeispiel 2 beschriebene Verfahren wird im wesentlichen wiederholt mit dem Unterschied, daß 10^6 Plaques von Bakteriophage Charon 4A/Kaninchen-Genom-Sammlung, die unter Verwendung von digerierter Kaninchen-DNA hergestellt wird (Maniatis, u. a., Cell, **15**, 687 [1978]), anstelle von digerierter Human-DNA verwendet wird. $6,7 \times 10^5$ Plaques von Bakteriophage Charon 4A/Kaninchen-Genom-Sammlung werden anstelle von 10^6 Plaques der Bakteriophage Charon 4A/Human-Genom-Sammlung verwendet. Dabei werden zwei Bakteriophagenstämme (RG-1 und RG-2) gewonnen, die das Kaninchen-Genom-TNF-Gen enthalten.

Schritt 7

(Southern Tüpfelanalyse von Humanklonen)

Unter Verwendung der in Schritt 5 von Bezugsbeispiel 2 gewonnenen Bakteriophagen HG-3, HG-6 und HG-7 wird DNA von jedem Bakteriophagen nach den folgenden Verfahrensweisen gewonnen:

6×10^{10} Zellen von *E. coli* LE 392 (Wirtszelle) werden in 18 ml SM suspendiert, und 3×10^9 PFU von Bakteriophage HG-3 werden zugegeben, so daß die *E. coli* 20 Minuten lang bei 37°C infiziert werden können. Danach wird die gewonnene Mischung zu 3 Litern NZ-Nährflösung gegeben, und die Kultur wird 23 Stunden lang bei 37°C geschüttelt. 60 ml CHCl_3 werden der Mischung zugesetzt, und die Kultur wird weitere 30 Minuten lang geschüttelt. NaCl wird zu der Mischung bis zu einer endgültigen Konzentration von 1 M gegeben, das Gemisch wird 15 Minuten lang stehen gelassen, worauf Zentrifugieren zur Gewinnung der überstehenden Flüssigkeit folgt. Anschließend wird Polyethylenglycol (relative Molekülmasse: etwa 6000) zu der Mischung gegeben, so daß die Konzentration von Polyethylenglycol 10% (M/V) erreicht, und es folgt eine Abstehtzeit von 22 Stunden bei 4°C . Bakteriophagen werden durch Zentrifugieren gesammelt. Die gewonnenen Bakteriophagen werden in 28 ml SM suspendiert, und ein gleiches Volumen von CHCl_3 wird zugegeben. Nach einer Rührzeit von 30 Sekunden mit Hilfe eines Vortex wird das Gemisch zur Gewinnung der wäßrigen Phase zentrifugiert. Der wäßrigen Phase wird SM zugegeben, so daß die Gesamtmenge 30 ml erreicht. 26,4 g CsCl werden zu der gewonnenen Mischung gegeben und vorsichtig gelöst, worauf Ultrazentrifugieren (45000 U/min, 20 Stunden) zur Gewinnung von Bakteriophagen in Form eines Bandes folgt. Das gewonnene, Bakteriophagen enthaltende Gemisch wird gegen 10 mM NaCl — 50 mM Tris (pH-Wert 8) — 10 mM MgCl_2 dialysiert. Danach werden EDTA, Proteinase K und SDS zu dem Gemisch gegeben, so daß ihre Konzentrationen 20 mM, $50\text{ }\mu\text{g/ml}$ bzw. 0,5% (M/V) betragen. Anschließend wird das Gemisch von Phenol und CHCl_3 (1:1 Volumen) und dann mit CHCl_3 extrahiert. Die gewonnene wäßrige Phase wird gegen 10 mM Tris (pH-Wert 8) — 1 mM EDTA dialysiert. Die Ultraviolett-Absorptionsmessung der gewonnenen wäßrigen Phase zeigt, daß reine DNA des Bakteriophagen HG-3 gewonnen wurde.

Im wesentlichen werden die gleichen Verfahrensweisen wie hinsichtlich der Herstellung von DNA des Bakteriophagen HG-3 beschrieben wiederholt, um DNAs von Bakteriophagen HG-6 und HG-7 zu gewinnen.

Auf diese Weise werden $2920\text{ }\mu\text{g}$ HG-3, $1100\text{ }\mu\text{g}$ HG-6 und $819\text{ }\mu\text{g}$ HG-7 gewonnen.

In Übereinstimmung mit der Southern-Methode (E. M. Southern, J. Mol. Biol., **98**, 503 [1975]), wird die Southern Tüpfelanalyse der gewonnenen DNAs durchgeführt. Die Verfahren und Bedingungen sind wie folgt:

- 1) DNA:
HG-3 825 ng je
HG-6 935 ng je
HG-7 685 ng je

- 2) Digestion mit verschiedenen Restriktionsenzymen:
 10 Einheiten **Bam**HI, 10 Einheiten **Eco**RI
 10 Einheiten **Bam**HI + 10 Einheiten **Eco**RI
 10 Einheiten **Hind**III
 10 Einheiten **Hind**III + 10 Einheiten **Eco**RI
 10 Einheiten **Pvu**II
 37°C, 3 h
 - 3) Elektrophorese:
 0,8% Agarosegel
 TAE
 28V, 15,5h
 - 4) Übertragung auf Nitrocellulosefilter:
 (siehe E. M. Southern, J. Mol. Biol., **98**, 503 [1975])
 - 5) Prähybridisierung:
 30ml FDSS
 42°C, 6h
 - 6) Hybridisierung:
 5'-Fragment (1×10^5 cpm/ml) von pR 18 (hergestellt in Schritt 4 von Bezugsbeispiel 2)
 42°C, 14h
 - 7) Waschen:
 2 $\times$ SSC — 0,1% SDS bei Raumtemperatur
 Eintauchzeit $\downarrow$ 10 min $\times$ 4
 1 $\times$ SSC — 0,1% SDS bei 50°C
 Eintauchzeit 30 min $\times$ 2
 - 8) Belichtung:
 XAR-5 (Eastman Kodak Company, USA)
 -80°C, 2 Verstärkerfolien, 14h
- Die Ergebnisse der Hybridisierung sind in Tabelle 4 enthalten.

Tabelle 4

Enzym	Klon (Bakteriophage)	Hybridisierungs-Fragmentgröße mit Sonde (pR 18)	
		5'-Ende	3'-Ende
Bam HI	HG-3	6,7 kb	←
	-6	11,2 kb	←
	-7	9,2 kb	←
Bam HI + Eco RI	HG-3	2,9 kb	←
	-6	2,9 kb	←
	-7	2,9 kb	←
Eco RI	HG-3	2,9 kb	←
	-6	2,9 kb	←
	-7	2,9 kb	←
Hind III + Eco RI	HG-3	2,9 kb	←
	-6	2,9 kb	←
	-7	2,9 kb	←
Hind III	HG-3	9,7 kb	←
	-6	4,1 kb	←
	-7	9,7 kb	←
Pvu II	HG-3	2,2 kb	0,9 kb
	-6	1,9 kb	0,9 kb
	-7	2,2 kb	0,9 kb

Anmerkung: Das Symbol „←“ bedeutet, daß das gleiche Fragment hybridisiert.

Schritt 8

(Southern Tüpfelanalyse von Kaninchenklonen)

Im wesentlichen werden die gleichen Verfahrensweisen wie in Schritt 7 von Bezugsbeispiel 2 wiederholt, nur daß jede der Bakteriophagen RG-1 und RG-2 anstelle jeder der Bakteriophagen HG-3, HG-6 und HG-7 verwendet werden. Damit wird die Southern-Tüpfelanalyse vorgenommen. Als Ergebnis zeigt sich, daß pR 18 5'-Fragment mit einem einzigen Bandfragment von Fragmenten hybridisiert wird, die durch Spaltung von RG-1 und RG-2 mit jeweils **Bam**HI, **Eco**RI, **Bgl**II, **Hind**III und **Bam**HI + **Eco**RI gewonnen wurden.

Schritt 9

(Konstruktion von Bakterioklonen, die Human-Genom-TNF-Gen enthalten)

Es wird das Verfahren von Landy, u. a. (Biochemistry, Bd. 13, 2134 [1974]) zur Gewinnung von DNA von HG-3 angewandt, wie sie im obigen Schritt 5 erhalten wurde. 33 µg der resultierenden HG-3 DNA werden mit 80 Einheiten von **EcoRI** bei 37°C 3 Stunden lang digeriert. Das Digest wird auf 1%igem niedrigschmelzendem Agarosegel elektrophoresiert (Bedingungen: 1× TAE, 20V, 14,5h). Das 2,9-KB-Band wird nach der Beschreibung von T. Maniatis (Molecular Cloning, Cold Harbor Spring Laboratory, S. 377 [1981]) von dem Agarosegel isoliert. Das ausgeschnittene Gel des 2,9-KB-Band-Abschnittes wird speziell 15 Minuten lang auf 65°C erhitzt. Das **EcoRI**-gespaltene HG-3-Fragment mit einer Länge von 2,9 KB (anschließend häufig als „HG-3/**EcoRI**-2,9-KB-Fragment“ bezeichnet) wird durch dreimalige Extraktion mit Phenol und anschließend dreimalige Extraktion mit Ether von dem geschmolzenen Gel zurückgewonnen und anschließend mit Ammoniumacetat enthaltendem Ethanol ausgefällt. Dadurch werden 637 ng (Ausbeute: etwa 30%) HG-3/**EcoRI**-2,9-KB-Fragment gewonnen.

255 ng des oben gewonnenen Fragmentes werden mit 56,5 ng **EcoRI**-gespaltenem pUC 13 (J. Messing, Methods in Enzymology, Bd. 101, 20 [1983]) unter Verwendung von 2,5 Einheiten von T₄-Ligase 20 Stunden lang bei 4°C ligiert.

E. coli K 12 Stamm JM83 wird unter Verwendung des oben gewonnenen Ligationsproduktes transformiert. Der **E. coli** K 12 Stamm JM83 wird speziell in LB-Medium gezüchtet, bis die optische Dichte der Nährlösung 0,3 bei 550 nm erreicht. 50 ml der gezüchteten **E. coli** K 12 Stamm JM83 Kultur werden gesammelt, mit 25 ml von 10 mM MOPS (pH-Wert 7,0) — 10 mM RbCl gewaschen und erneut in 25 ml 0,1 M MOPS (pH-Wert 6,5) — 50 mM CaCl₂ — 10 mM RbCl suspendiert. Die Suspension wird 30 Minuten lang auf Eis gekühlt, zentrifugiert und erneut in einer Mischung von 2 ml 0,1 M MOPS (pH-Wert 6,5) — 50 mM CaCl₂ — 10 mM RbCl und 30 µl DMSO suspendiert. Zu 203 µl der Suspension werden 10 µl einer wässrigen Ligationsproduktlösung gegeben, die 10 ng des Ligationsproduktes enthält. Die Mischung wird 30 Minuten lang auf Eis gekühlt und danach 60 Sekunden lang auf 40°C erhitzt. Unmittelbar danach werden 5 ml auf 37°C vorgewärmte LB-Nährlösung zu dem erhitzten Gemisch gegeben, worauf eine einstündige Inkubation bei 37°C folgt. Die gewonnene Kulturenährlösung wird zentrifugiert, und die überstehende Flüssigkeit wird entfernt. Zu dem resultierenden Zellpellet wird ein LB-Medium gegeben und dann auf eine 30 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml X-gal enthaltende LB-Platte aufgeimpft. Den **E. coli** K 12 Stamm JM83 enthaltende Kolonien, die mit den den Insert enthaltenden Plasmiden transformiert wurden, sind weiß, während die **E. coli** K 12 Stamm JM83 enthaltenden, die nur mit dem Plasmid transformiert wurden, blau sind. Die gewonnenen weißen Kolonien werden wieder auf eine 30 µg/ml Ampicillin und 40 µg/ml X-gal enthaltende LB-Platte zur Bestätigung aufgeimpft.

Von den oben gewonnenen weißen Kolonien werden zehn Kolonien (Bakterienklone) ausgewählt und unter Anwendung einer Mini-Präp-Technik gescreent.

Jede Kolonie wird über Nacht in 30 µg/ml Ampicillin enthaltendem LB-Medium gezüchtet. Die gewachsenen Zellen werden gesammelt und in einer Lösung, die 2 mg/ml Lysozym — 50 mM Glucose — 10 mM EDTA — 25 mM Tris-HCl (pH-Wert 8,0) enthält, suspendiert. Die Suspension wird 5 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen, worauf die Zugabe von 200 µl 0,2 N NaOH — 1% SDS folgt. Nach langsamem Rühren bleibt die Suspension 2 min bei Raumtemperatur stehen. Anschließend werden 150 µl 3 M Natriumacetat (pH-Wert 5,2) zugegeben, worauf eine Abstezeit von 10 min bei -20°C vorgesehen ist, auf die Zentrifugieren von 15 min zur Rückgewinnung der resultierenden überstehenden Flüssigkeit folgt. Der überstehenden Flüssigkeit werden 900 µl kaltes Ethanol zugesetzt, worauf Zentrifugieren über einen Zeitraum von 5 min zur Gewinnung des resultierenden Präzipitats folgt. Das gewonnene Präzipitat wird mit 70%igem Ethanol gewaschen und zur Gewinnung einer Plasmid-DNA getrocknet. Durch das oben erläuterte Verfahren werden zehn Plasmid-DNAs gewonnen.

Jede Plasmid-DNA wird in 10 mM Tris — 0,1 mM EDTA (pH-Wert 8,0) gelöst, mit **EcoRI** digeriert und zur Restriktionsanalyse elektrophoresiert. Die Bedingungen für die Digestion und Elektrophorese sind wie folgt:

Digestion: Plasmid-DNA-Lösung, ein Fünftel der oben hergestellten Menge; **EcoRI**, 3 Einheiten; 37°C; 1 1/2 h.

Elektrophorese: 1%iges Agarosegel; 1× TAE; 120 V, 2 h.

Die obige Restriktionsanalyse zeigt, daß acht von zehn Klonen positiv sind. Das heißt die acht Klone haben 2,9-KB-Fragment. Von den acht positiven Klonen wird ein Klon ausgewählt und als **E. coli** Stamm JM83 (pHGE) (ATCC 39656) bezeichnet.

Im wesentlichen werden die gleichen Verfahren wie oben in Schritt 2 zur Herstellung von 1,89 mg pHGE DNA wiederholt, nur daß **E. coli** K 12 Stamm JM83 (pHGE) anstelle von pB2-7 und pR 18 aufweisenden **E. coli** verwendet wird.

Schritt 10

(Subklonen von **EcoRI**-gespaltenem RG-1)

30 µg im obigen Schritt 6 hergestelltes RG-1 werden mit **EcoRI** digeriert. Aus dem resultierenden Fragmentgemisch wird das Fragment mit einer Länge von etwa 3,5 KB in im wesentlichen der gleichen Weise wie oben in Schritt 9 zurückgewonnen, nur werden dafür das oben hergestellte Fragmentgemisch und 0,8%iges niedrigschmelzendes Agarosegel eingesetzt. Auf diese Weise wird 1,0 µg **EcoRI**-gespaltenes RG-1 Fragment (etwa 3,5 KB) gewonnen. Das oben gewonnene **EcoRI**-gespaltene RG-1 Fragment (3,5 KB) wird an **EcoRI**-digeriertes pUC13 in im wesentlichen der gleichen Weise wie in Schritt 9 oben ligiert, nur wird das oben gewonnene **EcoRI**-gespaltene Fragment (3,5 KB) anstelle von **EcoRI**-gespaltenem HG-3 Fragment (2,9 KB) verwendet. Die Transformation von **E. coli** K 12 Stamm JM83, das Screenen von Bakterienklonen, die Digestion von Klonen und die Elektrophorese werden in im wesentlichen der gleichen Weise wie in Schritt 9 ausgeführt, nur wird das oben gewonnene Ligationsprodukt verwendet. Der gewonnene Klon wird als **E. coli** K 12 Stamm JM83 (pRGE) (ATCC 39655) bezeichnet. Im wesentlichen werden die gleichen Verfahrensweisen wie im obigen Schritt 2 zur Herstellung von 1,70 mg pRGE DNA wiederholt, mit dem Unterschied, daß **E. coli** K 12 Stamm JM83 (pRGE) anstelle von pB2-7 und pR-18 verwendet wird.

Schritt 11

(Restriktionsenzymanalyse von pHGE Plasmid DNA)

Die Restriktionsenzymanalyse von pHGE Plasmid DNA, die im obigen Schritt 9 gewonnen wurde, wird nach dem von Maniatis (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, 98 [1982]) beschriebenen Verfahren vorgenommen.

Die angewandten Verfahrensweisen und Bedingungen sind wie folgt.

- 1) Digestion von pHGE DNA mit **EcoRI**:

18,6 µg pHGE DNA

64 Einheiten **EcoRI**

37°C, 2 h

- 2) Ethanolpräzipitation: Präzipitat

- 3) Zugabe von destilliertem Wasser zum Präzipitat:
Herstellung von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ **EcoRI**-gespaltenem pHGE Stamm
- 4) Digestion mit verschiedenen Restriktionsenzymen:
1 μg pHGE/**EcoRI**
Restriktionsenzym: 5 Einheiten **PvuII**, 5 Einheiten **PvuII** + 10 Einheiten **RsaI**, 10 Einheiten **RsaI**, 4 Einheiten **MstII**, 3 Einheiten **AvaI**, 9 Einheiten **PstI**
37°C, 2h
- 5) Elektrophorese:
2%iges Agarosegel, 1 $\times$ TAE,
28V, 14,5h
- 6) Übertragung auf Nitrocellulosefilter:
(siehe E. M. Southern, J. Mol. Biol., **98**, 503 [1975])
- 7) Erste Prähybridisierung:
30ml FDSS
42°C, 6h
- 8) Erste Hybridisierung:
5'-Fragment (5×10^4 cpm/ml) von pR 18 (hergestellt im obigen Schritt 4)
42°C, 14h
- 9) Waschen:
2 $\times$ SSC — 0,1% SDS, bei Raumtemperatur
Eintauchzeit 10 min $\times$ 4
1 $\times$ SSC — 0,1% SDC bei 50°C
Eintauchzeit 30 min $\times$ 2
- 10) Belichtung:
XAR-5 (Eastman Kodak Company, USA)
-80°C, 2V Verstärkerfolien, 17,5h
- 11) Auswaschen:
0,5M NaOH — 1,5M NaCl (Eintauchzeit: 1 min)
0,5M Tris — 1,5M NaCl (Eintauchzeit: 1 min)
3 $\times$ SSC (Eintauchzeit: 1 min)
- 12) Belichtung:
In der gleichen Weise wie oben unter 10) ausgeführt, nur beträgt die Belichtungszeit 19h.
- 13) Zweite Prähybridisierung:
In der gleichen Weise wie oben unter 7)
- 14) Zweite Hybridisierung:
pB2-7 Insert (hergestellt im obigen Schritt 3)
42°C, 16,5h
- 15) Waschen:
In der gleichen Weise wie oben unter 9)
- 16) Belichtung:
In der gleichen Weise wie oben unter 10), nur betrug die Belichtungszeit 19,5h
- 17) Auswaschen:
In der gleichen Weise wie oben unter 11)
- 18) Belichtung:
In der gleichen Weise wie oben unter 10), nur betrug die Belichtungszeit 20h
- 19) Dritte Prähybridisierung:
In der gleichen Weise wie oben unter 7)
- 20) Dritte Hybridisierung:
3'-Fragment ($4,5 \times 10^5$ cpm/ml) von pR 18 (Hergestellt im obigen Schritt 4), 42°C, 15h
- 21) Waschen:
In der gleichen Weise wie oben unter 9)
- 22) Belichtung:
In der gleichen Weise wie oben unter 10).

Die Ergebnisse der Restriktionsenzymanalyse werden in Fig. 4 gezeigt.

Schritt 12

(Restriktionsenzymanalyse von pRGE Plasmid DNA)

In im wesentlichen der gleichen Weise wie im obigen Schritt 11 wird die Restriktionsenzymanalyse von im obigen Schritt 9 hergestellter pRGE Plasmid DNA vorgenommen, nur wird pRGE Plasmid DNA anstelle von pHGE Plasmid DNA verwendet. Die Restruktionskarte des gewonnenen pRGE DNA Inserts wird in Fig. 5 gezeigt.

Schritt 13

(Bestimmung von Basensequenzen von Kaninchen-TNF-Gen und Human-TNF-Gen)

Im wesentlichen werden die gleichen Verfahrensweisen wie im obigen Schritt 2 wiederholt, nur werden im obigen Schritt 9 gewonnener **E. coli** K 12 Stamm JM83 (pHGE) und im obigen Schritt 10 gewonnener **E. coli** K 12 Stamm JM83 (pRGE) anstelle von **E. coli** K 12 Stamm MC 1061 mit pB-27 und **E. coli** K 12 Stamm MC 1061 mit pR 18 verwendet. Dadurch werden jeweils 150 μg pRGE Plasmid DNA und pHGE Plasmid DNA gewonnen.

Die Basensequenzen von pRGE und pHGE werden nach dem Maxam-Gilbert-Verfahren (Maxam, u. a., Methods in Enzymology, Bd. 55, 490 [1980], veröffentlicht von Academic Press) bestimmt.

Die in Bezugsbeispiel 2 bestimmte Basensequenz von pR-18 wird mit der oben bestimmten von pRGE verglichen, um die Struktur, einschließlich Exon und Intron, von Kaninchen-TNF-Gen zu ermitteln. Die Struktur von pRGE DNA Insert wird in Fig. 5 gezeigt. Anschließend wird die Basensequenz von pRGE mit der von pHGE verglichen, um die Homologie und Konsensussequenz um die Grenze zwischen Intron und Exon zu untersuchen. Dadurch wird die Struktur, einschließlich Exon und Intron, des Human-TNF-Gens ermittelt. Die Struktur von Human-TNF-Gen wird in Fig. 4 gezeigt, das Substanz-Gen wird in Fig. 4 (7, Fig. 57) gezeigt.

Die für Kaninchen-TNF und Human-TNF kodierende oben gewonnene Basensequenz wird anschließend dargestellt. Bei den Basensequenzen zeigen die oberen Reihen die für Kaninchen-TNF (R) kodierende Basensequenz und die untere Reihe die für Human-TNF (H) kodierende Basensequenz.

R	TCA	GCT	TCT	CGG	GCC	CTG	AGT	GAC	AAG	CCT	CTA	GCC	CAC	CTA	GTA
H	TCA	TCT	TCT	CGA	ACC	CCG	AGT	GAC	AAG	CCT	GTA	GCC	CAT	GTT	GTA
R	GCA	AAC	CCG	CAA	GTG	GAG	GGC	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	AGC	CAG	CGT
H	GCA	AAC	CCT	CAA	GCT	GAG	GGG	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	AAC	CGC	CGG
R	GCG	AAC	GCC	CTG	CTG	CGC	AAC	GGC	ATG	AAG	CTC	ACG	GAC	AAC	CAG
H	GCC	AAT	GCC	CTC	CTG	GCC	AAT	GGC	GTG	GAG	CTG	AGA	GAT	AAC	CAG
R	CTG	GTG	GTG	CCG	GCC	GAC	GGG	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	TCC	CAG	GTT
H	CTG	GTG	GTG	CCA	TCA	GAG	GGC	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	TCC	CAG	GTC
R	CTC	TTC	AGC	GGT	CAA	GGC	TGC	CGC	TCC	...	TAC	GTG	CTC	CTC	ACT
H	CTC	TTC	AAG	GGC	CAA	GGC	TGC	CCC	TCC	ACC	CAT	GTG	CTC	CTC	ACC
R	CAC	ACT	GTC	AGC	CGC	TTC	GCC	GTC	TCC	TAC	CCG	AAC	AAG	GTC	AAC
H	CAC	ACC	ATC	AGC	CGC	ATC	GCC	GTC	TCC	TAC	CAG	ACC	AAG	GTC	AAC
R	CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	AGC	CCC	TGC	CAC	CGG	GAG	ACC	CCC	GAG
H	CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	AGC	CCC	TGC	CAG	AGG	GAG	ACC	CCA	GAG
R	GAG	GCT	GAG	CCC	ATG	GCC	TGG	TAC	GAG	CCC	ATC	TAC	CTG	GGC	GGC
H	GGG	GCT	GAG	GCC	AAG	CCC	TGG	TAT	GAG	CCC	ATC	TAT	CTG	GGA	GGG
R	GTC	TTC	CAG	TTG	GAG	AAG	GGT	GAC	CGG	CTC	AGC	ACC	GAG	GTC	AAC
H	GTC	TTC	CAG	CTG	GAG	AAG	GGT	GAC	CGA	CTC	AGC	GCT	GAG	ATC	AAT
R	CAG	CCT	GAG	TAC	CTG	GAC	CTT	GCC	GAG	TCC	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT
H	CGG	CCC	GAC	TAT	CTC	GAC	TTT	GCC	GAG	TCT	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT
R	GGG	ATC	ATT	GCC	CTG										
	GGG	ATC	ATT	GCC	CTG										

Anmerkung: Das Symbol „..." bedeutet, daß dieser Abschnitt in der Basensequenz für die Kaninchen-TNF kodierender DNA Null ist, und daher sind zwei Kodone neben diesem Symbol an dessen beiden Seiten direkt verbunden.

Schritt 14

(Synthese von Oligodesoxynucleotiden)

In einen 500- μ l-Reaktionsbehälter aus rostfreiem Stahl mit Stahlfiltern an jedem Ende werden 20 mg eines Polystyrenharzes gegeben, mit dem ein Nucleosid (2,0 μ M) über eine Succinatkopplung verbunden ist. Das Harz wird mit Zinkbromid (1 M) in Dichlormethan-Isopropanol (85:15) behandelt, um die Dimethoxytrityl-(DMT)-Schutzgruppe zu entfernen, mit Dimethylformamid, Pyridin und Acetonitril gewaschen und mit einem Stickstoffstrom getrocknet. Zu dem getrockneten Harz wird eine Lösung von DMT-Nucleotid (20 μ M) und Mesitylsulfonylnitrotriazol (60 μ M) in 200 μ l Pyridin gegeben. Die Kopplungsreaktion läßt man 20 Minuten lang bei 45°C ablaufen. Dieser Zyklus der Schutzgruppenentfernung und der Kopplung wird für nachfolgende Nucleotide wiederholt, bis das verlangte Oligodesoxynucleotid auf dem Harz angesammelt ist. Das Harz wird danach zur Entfernung des Oligodesoxynucleotids davon behandelt und nach der Beschreibung von Ito, Ike, Ikuta und Itakura (Nuc. Ac. Res. 10: 1755 [1982]) gereinigt.

Dadurch werden die folgenden Oligodesoxynucleotide gewonnen.

- 1) 5'-AATTCATGTCATCTTCTCGAACCCGAGTGACAA-3'
- 2) 3'-GTACAGTAGAAGAGCTTGGGGCTCACTGTTCCGG-5'
- 3) 5'-GCCTGTAGCCCATGTTGTAGCAAACCTCAAGC-3'
- 4) 3'-ACATCGGGTACAACATCGTTTGGGAGTTTCGACT-5'

Schritt 15

(Konstruktion vom M13mp9-HGE, das das Human-Minigen für TNF enthält)

Plasmid pHGE (10 μ g) wird mit EcoRI (20 Einheiten) digeriert. Nach der Elektrophorese auf einem 1%igen niedrig-schmelzenden Agarosegel wird das 2,9KB Fragment eluiert. Dieses Fragment wird in das EcoRI-Fragment von der replikativen Form von M13mp9-Phage eingesetzt. Der M13mp9 Phage wird gewählt, weil er besonders für die Gewinnung von Abschnitten von DNA geeignet ist. Das Produkt geht in E. coli JM 103 über (transfects to) (BRL [Bethesda Research Laboratories, Inc., USA] User Manual/M13mp7 Clonig/, Dideoxy' sequencing, 1980). Das Produkt wird als M13mp9-HGE bezeichnet.

Schritt 16

(Deletion [Tilgung] von Intron 3 unter Verwendung von M13mp9-HGE einsträngiger DNA und Deleter E3-4)

Die einsträngige DNA von M13mp9-HGE wird nach dem Verfahren von BRL User Manual/M13mp7-Cloning/, Dideoxy'-sequencing, 1980, hergestellt.

In Schritt 14 erzeugtes Oligodesoxynucleotid 4)

3'-ACATCGGGTACAACATCGTTTGGGAGTTCGACT-5'

wird als Deleter für das Intron 3 verwendet. Der Deleter für das Intron 3 wird als E3-4 bezeichnet.

Der Deleter E3-4 besitzt eine Basensequenz, die der Basensequenz der Basen vor (Exon 3) und nach (Exon 4) von Intron 3, das getilgt werden soll, komplementär ist. Die Tilgung von Intron 3 erfolgt in Übereinstimmung mit der Beschreibung von Wallace, u. a., Science **209**: 1396 (1980) wie folgt.

E3-4 (164 ng, 15 pMol) wird unter Verwendung von T4-Kinase und ATP (3 mM) phosphoryliert und zu dem Templat M13mp9-HGE (1,65 µg, 0,5 pMol) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird auf 65°C erhitzt, 5 Minuten lang auf Raumtemperatur abgekühlt und schließlich in Eiswasser gekühlt. Zu dATP, dCTP, dGTP, dTTP und ATP (0,4 mM) werden Klenow-Fragment (5 Einheiten), 10 Einheiten von T4-Ligase in Hin-Puffer (Wallace, u. a., Nuc. Ac. Res. **9**: 3647 [1981]), 10 mM Tris-HCl (pH-Wert 7,2), 2 mM MgCl₂ und 1 mM β-Mercaptoethanol gegeben. Das Reaktionsgemisch (endgültiges Volumen 50 µl) wird 30 Minuten lang bei 4°C inkubiert und danach 30 Minuten lang bei Raumtemperatur. Die DNA von der durch Oligodesoxynucleotid angeregten Reaktion wird zur Transformation von *E. coli* JM 103 in Übereinstimmung mit dem Verfahren von BRL User Manual/M13mp7-Cloning/, Dideoxy'-sequencing, 1980 verwendet. Auf diese Weise gewonnene Plaques werden auf YT-Platten geklebt (J. H. Miller, S. 433, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory [1972]). Die gewonnenen Kolonien werden 2 Stunden lang bei 55°C mit ³²P-markiertem E3-4 hybridisiert. Für diesen Schritt wird der Deleter als Sonde zur Identifizierung von Sequenzen von DNA, die die entsprechende komplementäre Basensequenz nach Tilgung des Introns haben, benutzt. Phage wird von denjenigen Kolonien isoliert, die mit dem Deleter hybridisieren.

Der resultierende Phage wird auf Platten aufgebracht, und Plaques werden auf YT-Platten geklebt. Die Klonen läßt man 2 Stunden lang bei 55°C mit ³²P-markiertem E3-4 hybridisieren. Es werden positive Klonen erhalten, und die Phagen-DNA wird sequenziert, um denjenigen Phagen auszuwählen, in dem Intron 3 vollständig getilgt ist. Ein solcher Phage wird als mp9-HGEΔ3-1 bezeichnet.

Schritt 17

(Konstruktion von pHTNF-lacUV5-2)

Die replikative Form von mp9-HGEΔ3-1 wird mit **EcoRI** digeriert. Das **EcoRI**-Fragment wird isoliert und mit **EcoRI**-gespaltenem pBR 327 zur Gewinnung des Plasmids pHGEΔ3-1 geklont.

Die Konstruktion von weiterem Plasmid wird unter Verwendung von Plasmid pHGEΔ3-1 ausgeführt, um ein solches Plasmid zu gewinnen, das direkt zur Expression von TNF in *E. coli* bei Verwendung von lacUV5 als Promotor führen wird. Die Verfahrensweisen werden schematisch in Fig. 7 gezeigt. Zunächst werden 10 µg Plasmid pHGEΔ3-1 mit 10 Einheiten von **AvaI** und **EcoRI** (hergestellt und vertrieben von Bethesda Research Laboratories Inc., USA) zwei Stunden lang bei 37°C digeriert und auf einem 4Ma.-% Polyacrylamidgel zur Isolierung von Fragmenten elektrophoresiert. Durch Elektroelution wird etwa 1 µg Fragment von dem Gel isoliert. In der gleichen Weise wie in Schritt 14 werden zwei in Fig. 7 gezeigte Oligodesoxynucleotide synthetisiert, und zwar 5'-AATTCATGTCATCTTCTCGAACC-3' und 5'-TCGGGGTTCGAGAAGATGACATG-3'. Danach wird jedes 5'-Ende der beiden Oligodesoxynucleotide (etwa 100 pMol) unter Verwendung von T4-Polynucleotid-Kinase nach dem in der Literaturangabe (3), Seite 122, beschriebenen Weise phosphoryliert. Nach Beendigung der Reaktion wird das Reaktionsgemisch zuerst mit Phenol und dann mit Chloroform extrahiert. Danach werden die dabei gewonnenen synthetischen Oligomere mit 5 µg des zuvor gewonnenen **AvaI**-**EcoRI**-Fragmentes von Plasmid pHGEΔ3-1 gemischt und in Ethanol ausgefällt. Diese Fragmente werden über Nacht bei 4°C unter Verwendung von 10 Einheiten T4-Ligase nach dem in Literaturangabe (1), Seite 37, beschriebenen Verfahren ligiert. Nach Beendigung der Reaktion wird das Gemisch mit Ethanol ausgefällt, worauf Elektrophorese auf einem 4Ma.-% Polyacrylamidgel zur Gewinnung von Fragment durch Elektroelution folgt.

Nach dem von F. Fuller („Gene“, **19**, S. 42-54 [1982]) beschriebenen Verfahren wird Plasmid pOP95-15 hergestellt.

Ein µg pOP95-15 wird mit **EcoRI** digeriert und mit Phenol und danach mit Chloroform extrahiert, worauf Ethanolpräzipitation zur Gewinnung eines Vektors folgt. Unter Verwendung von T4-DNA-Ligase werden 0,5 µg des gewonnenen Vektors mit dem oben erhaltenen Fragment ligiert. Nach der in Literaturangabe (4), Seite 20, beschriebenen Verfahrensweise wird *E. coli* JM 101 (ATCC 33876) unter Verwendung des oben gewonnenen Vektors transformiert und auf einem Agarmedium, das 1 mM IPTG und 0,004 M/V% X-gal enthält, gezüchtet, um etwa 100 weiße Kolonien zu erhalten.

Plasmid-DNA wird von diesen Transformanten hergestellt und mit **EcoRI** digeriert, um diejenigen Plasmide, die das vorgesehene **EcoRI**-Fragment enthalten, zu identifizieren. Zur Untersuchung der Einfüguungsrichtung, werden diese Plasmide mit **PvuII** und **PstI** digeriert und auf einem 1,5Ma.-% Agarosegel elektrophoresiert, um Plasmide auszuwählen, die Fragmente von etwa 1280 Basenpaaren und etwa 2600 Basenpaaren ergeben, wodurch ersichtlich wird, daß die Richtung der Transcription des lac UV5-Promotors mit derjenigen der für TNF kodierenden Oligodesoxynucleotide übereinstimmt.

Die Basensequenzanalyse zeigt, daß diese beiden Plasmide die gleiche Sequenz haben, und daß der lac UV5-Promotor, das synthetisierte Oligodesoxynucleotid und DNA einwandfrei miteinander kombiniert sind. Das gewonnene Plasmid wird als pHTNF-lacUV5-2 bezeichnet.

E. coli, die pHTNF-lacUV5-2 enthalten, werden in einem herkömmlichen Nährlösungsmedium gezüchtet. Die Bioanalyse des Produktes hinsichtlich von TNF-Aktivität zeigt fast die gleiche Aktivität, wie sie mit einem Plasmid pTNF-lacUV5-1, das das Kaninchen-TNF-Gen enthält, unter Steuerung durch den lac-Promotor erzielt wird.

Bezugsbeispiel 3

Unter Verwendung von Plasmid pHGE und der Oligodesoxynucleotide 1 bis 4, die nach dem in den Schritten 1 bis 14 von Bezugsbeispiel 2 beschriebenen Verfahren gewonnen wurden, wird pHTNF-lacUV5-1 in Übereinstimmung mit dem in Fig. 6 veranschaulichten Verfahren erzeugt.

Bezugsbeispiel 4

Schritt 1

(Reinigung von Antigen)

E. coli, die in Bezugsbeispiel 3 hergestelltes Plasmid pHTNFlacUV5-1 enthalten, werden in herkömmlicher Weise gezüchtet. Um den vorgesehenen Human-TNF zu erzeugen, wird zu der resultierenden Kultur zu 1 mM IPTG zur Auslösung der Induktion gegeben, und die Kultur weiterhin inkubiert, um Zellen von **E. coli** zu erhalten, die den Human-TNF enthalten. Die Zellen werden durch Zentrifugieren gesammelt, worauf Ultraschallung in 1 Liter 0,04 M Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 7,8) folgt, um dadurch einen den Human-TNF enthaltenden Zellextrakt zu gewinnen.

Der Zellextrakt hat eine Aktivität von $4,5 \times 10^5$ U/ml und eine spezifische Aktivität von $3,0 \times 10^4$ U/mg.

Der Zellextrakt wird auf eine ausreichend mit 0,04 M Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 8,0) äquilibrierte Säule von DEAE-Sephacryl CL-6B (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemicals AB, Schweden) aufgegeben. Die Säule wird mit 0,4 M Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 8,0) gewaschen und danach erfolgt die Eluierung unter Verwendung von 0,1 M NaCl enthaltendem 0,04 M Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 8,0) als Eluierungsmittel. Die Fraktion mit zytotoxischer Aktivität gegenüber L-Zellen wird durch Ultrafiltration konzentriert, um eine rohe Lösung mit einer spezifischen Aktivität von $4,0 \times 10^5$ U/mg zu gewinnen.

Die rohe Lösung wird auf eine mit 5 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,4), der 0,15 M NaCl enthält, äquilibrierte Säule von Sephacryl S-200 (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemical AB, Schweden) aufgegeben. Die Gelfiltration erfolgt durch die Zugabe der gleichen Pufferlösung zu der Säule. Die Fraktion mit zytotoxischer Aktivität gegenüber L-Zellen wird durch Ultrafiltration konzentriert, um eine gereinigte Lösung zu erhalten, die eine zytotoxische Aktivität gegenüber L-Zellen von $2,0 \times 10^5$ U/ml hat und Human-TNF mit einer spezifischen Aktivität von $7,5 \times 10^5$ U/mg enthält.

Schritt 2

(Immunisierung einer Maus)

Die in Schritt 1 oben gewonnene gereinigte Lösung wird mit einem gleichen Volumen vollständigem Freund's Adjuvans vermischt und zur Gewinnung einer Emulsion emulgiert. Die dadurch gewonnene Emulsion wird einer männlichen BALB/c-Maus intradermal dreimal in Abständen von 2 Wochen verabreicht, um eine Immunisierung der Maus zu erreichen. Die Menge der verabreichten Emulsion beträgt 0,2 ml/Verabreichung/Maus. 4 Wochen nach der dritten Verabreichung der Emulsion erhält die Maus intraperitoneal 0,5 ml der gereinigten, in Schritt 1 gewonnenen Lösung, um die endgültige Immunisierung herbeizuführen.

Schritt 3

(Zellfusion)

3 Tage nach der endgültigen Immunisierung wird die Maus getötet und die Milz der Maus entfernt. Die Milz wird in Stückchen geschnitten, worauf Filtration unter Druck unter Verwendung eines rostfreien Stahlnetzes zur Gewinnung von Milzzellen folgt. Danach werden die Zellen in Eagle's Minimum Essential Medium (anschließend häufig als „MEM“ bezeichnet) suspendiert, um eine Milzzellen-Suspension in MEM zu erhalten. Die Milzzellen und Myelomzellen der Maus (P₃/X63-Ag8U1) werden jeweils dreimal mit MEM gewaschen und in einem Verhältnis von 4:1 vermischt, worauf 15 Minuten zentrifugieren mit 800 U/min folgt, um ein Präzipitat zu erhalten. Zu dem Präzipitat in einem Zentrifugenröhrchen werden allmählich 2 ml 44 (V/V) %iger Polyethylenglycol-2000-Lösung in MEM gegeben, um eine Mischung zu gewinnen. Das die Mischung enthaltende Zentrifugenröhrchen wird 1 Minute lang langsam in einem Wasserbad von 37 °C gedreht, damit die Zellfusion erfolgt. Danach wird der Mischung 1 ml MEM zugesetzt, und das die Mischung enthaltende Zentrifugenröhrchen wird langsam gedreht. Zu der Mischung wird weiterhin MEM mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min in einer solchen Menge gegeben, daß das Gesamtvolumen des resultierenden Gemischs 10 ml erreicht. Anschließend wird die Mischung 5 Minuten lang mit 600 U/min zentrifugiert, um ein Präzipitat zu erzeugen. Das Präzipitat wird in Rosewell Park Memorial Institute (anschließend meist als „RPMI“ bezeichnet) 1640-Medium, das 10 % fetäles Kalbsserum (anschließend meist als „FCS“ bezeichnet) enthält, suspendiert, um eine Suspension zu gewinnen, die Zellen in einer Menge von 7×10^5 Myelomzellen/ml enthält. Die Suspension wird in jede Vertiefung einer 96-Vertiefungs-Mikrotiterplatte, hergestellt von Flow Laboratories, Inc. (USA), in einer Menge von 0,1 ml/Vertiefung eingeimpft.

Am nächsten Tag werden in jede Vertiefung 0,1 ml RPMI 1640 — 10 % FCS-Medium gegeben, das HAT (1×10^{-4} M Hypoxanthin, 4×10^{-7} M Aminopterin und $1,6 \times 10^{-5}$ M Thymidin) enthält (anschließend als „HAT-Medium“ bezeichnet). Anschließend wird aller 3 oder 4 Tage die Hälfte des Mediums in jeder Vertiefung durch ein frisches HAT-Medium ersetzt. 7 Tage nach der Zugabe von RPMI 1640 — 10 % FCS-Medium, das HAT enthält, ist in verschiedenen Vertiefungen die Bildung von Hybridoma-Zellen zu beobachten, und 2 oder 3 Wochen später ist die Bildung von Hybridoma-Zellen in fast allen Vertiefungen festzustellen.

Schritt 4

(Screening von Antikörper bildenden Zellen und Klonen)

0,1 ml der überstehenden Flüssigkeit von der Kultur in der Vertiefung, in der die Bildung von Hybridoma-Zellen festzustellen ist, wird in jede Vertiefung einer 96-Vertiefungen aufweisenden Mikrotiterplatte gegeben, an der Human-TNF angebracht ist, und die Mikrotiterplatte wird 1 Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellen in jeder Vertiefung werden mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, die 0,1 % Rinderserumalbumin enthält. Den gewaschenen Zellen wird eine 10000fach verdünnte Lösung von mit Peroxydase markiertem Anti-Mäuse-IgG (Cappel Laboratories, Inc., USA) in einer Menge von 0,1 ml/Vertiefung zugesetzt, worauf sie 1 Stunde lang bei Raumtemperatur stehen gelassen werden. Dann werden die Zellen mit 0,1 % Rinderserumalbumin enthaltender physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Zu den gewaschenen Zellen wird eine Substrat-Lösung (30 mg o-Phenylendiamin, 7 µl 30%iges wäßriges Wasserstoffperoxid, 10 ml 0,1 M Zitronensäure und 10 ml 0,2 M Dinatriumhydrogenphosphat) in einer Menge von 0,15 ml/Vertiefung gegeben. 30 Minuten später wird das Absorptionsvermögen jeder Vertiefung bei 492 nm gemessen, um Vertiefungen zu finden, die einen Antikörper erzeugende Zellen enthalten.

Die Zellen in jeder Vertiefung, die eine hohe Antikörper-Aktivität zeigen, werden mit Hilfe eines Glaskapillarröhrchens entnommen und zur Gewinnung von Klonen geklont. Die Klone werden gescreent, wobei als Kriterium die Antikörper-Aktivität in der gleichen Weise wie unmittelbar oben beschrieben angewandt wird, um 2 Klone zu erhalten, die eine starke Antikörper-Aktivität aufweisen, d. h. Hybrid-Zell-Linie HII7C und Hybrid-Zell-Linie HII2F.

Die oben gewonnenen Klone werden jeweils in RPMI-1640-Medium, das 10 % FCS enthält, gezüchtet, um die Klonzellen zu vermehren. Danach werden die Klonzellen gesammelt und in RPMI-1640-Medium, das 15 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid enthält, suspendiert. Die dadurch gewonnene Suspension wird in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Schritt 5

(Herstellung von aszitischer, Hybridoma-Zellen enthaltender Flüssigkeit)

Jeweils 1×10^7 -Zellen der im obigen Schritt 4 gewonnenen beiden Hybridoma-Zellen werden in den Abdomen einer BALB/c-Maus eingepflegt, der vorher 0,2 ml Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan) zur Erzeugung von aszitischer Flüssigkeit intraperitoneal verabreicht worden waren. Nach 10 Tagen werden 3 bis 5 ml aszitische Flüssigkeit von der Maus entnommen.

Schritt 6

(Reinigung eines monoklonalen Antikörpers)

Zu 10 ml der in Schritt 5 gewonnenen aszitischen Flüssigkeit werden 2,66 g Ammoniumsulfat (Sättigung 35%) gegeben, und das auf diese Weise gewonnene Gemisch wird über Nacht bei 4°C gerührt, wodurch sich ein Präzipitat bildet. Das Präzipitat wird durch Zentrifugieren entnommen und auf eine Säule von DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia Fine Chemicals AB, Schweden) aufgegeben, die mit 0,01 M Phosphatpuffer (pH-Wert 8,0) äquilibriert wurde. Die Säule wird mit dem gleichen Puffer gewaschen, und danach erfolgt die Eluierung unter Verwendung von 0,01 M Phosphatpuffer (pH-Wert 8,0), der 0,2 M NaCl enthält, als Eluierungsmittel. Vom Boden der Säule gewonnene Fraktionen werden der Polyacrylamidgel-Elektrophorese unterzogen, um die einen monoklonalen Antikörper enthaltende Fraktion zu bestimmen. Es werden 97 mg eines monoklonalen Antikörpers gewonnen, der durch Hybrid-Zell-Linie HII7C erzeugt wurde (anschließend als „monoklonaler Antikörper HII7C“ bezeichnet) und 199 mg eines monoklonalen Antikörpers, der durch Hybrid-Zell-Linie HIII2F erzeugt wurde (anschließend als „monoklonaler Antikörper HIII2F“ bezeichnet).

Schritt 7

(Bestimmung einer Unterklasse von monoklonalem Antikörper)

Gemäß dem Ouchterlony-Immunodiffusionsverfahren (beschrieben z. B. von Hudson, u. a., in „Practical Immunology“, herausgegeben von Blackwell Scientific Publications [1976], S. 107–115) erfolgt die Bestimmung der Unterklasse unter Verwendung von Anti-Mäuse IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} (hergestellt und vertrieben von Miles Co., USA). Es wurde gefunden, daß beide, der monoklonale Antikörper HII7C und der monoklonale Antikörper HIII2F zur Klasse von IgG₁ gehören.

Schritt 8

(Eliminierung von Aktivität aus der physiologisch aktiven Substanz durch die Wirkung von monoklonalen Antikörpern)

Die gereinigte Lösung des in Schritt 1 gewonnenen Human-TNF wird mit 10% FCS enthaltendem MEM-Kulturmedium verdünnt, um Lösungen mit Konzentrationen von 20 U/ml und 200 U/ml zu gewinnen. Zwei oben gewonnene monoklonale Antikörper werden ebenfalls mit dem gleichen Kulturmedium verdünnt, um Lösungen mit entsprechender Konzentration zu erhalten. Die beiden Lösungen werden in jede Vertiefung einer 96-Vertiefung-Mikrotiterplatte in einer Menge von 0,05 ml/Vertiefung gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wird in jede Vertiefung 0,1 ml einer Suspension gegeben, die 10^5 L-M-Zellen/ml des gleichen Kulturmediums enthält. Anschließend werden im wesentlichen die gleichen Verfahrensschritte, wie sie für die in vitro Analysemethoden beschrieben wurden, wiederholt, um die zytotoxische Aktivität gegenüber L-Zellen zu bestimmen. Gleichzeitig wird auch die Untersuchung (A) durchgeführt, bei der weder der Human-TNF noch ein monoklonaler Antikörper zugesetzt wird, sowie die Untersuchung (B), bei der kein monoklonaler Antikörper zugegeben wird, aber der Human-TNF zugesetzt wird. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 enthalten, worin die Rate (%) der Eliminierung von Aktivität durch einen aus folgender Gleichung errechneten Wert angegeben wird

$$\frac{(\text{Absorptionsvermögen, ermittelt bei Untersuchung A}) - (\text{Absorptionsvermögen, ermittelt bei Untersuchung B})}{(\text{Absorptionsvermögen, ermittelt bei Untersuchung A})} \times 100$$

Tabelle 5

Art des monoklonalen Antikörpers	Konzentration der physiologisch aktiven Substanz (U/ml)	Konzentration von monoklonalem Antikörper (µg/ml)	Eliminierungsrate von Aktivität (%)
HII7C	20	50	100
		3,2	46
		0,2	6
	200	500	100
		32	70
		2,0	9
HIII2F	20	50	100
		3,2	100
		0,2	40
	200	500	100
		32	100
		2,0	93

Beide monoklonalen Antikörper eliminieren die Aktivität von Human-TNF bei hohen Konzentrationen vollständig. Bei niedrigen Konzentrationen weist der monoklonale Antikörper HIII2F eine höhere Eliminationsrate als der monoklonale Antikörper HII7C auf.

Schritt 9

(Messung des isoelektrischen Punktes von monoklonalen Antikörpern)

Zur Messung der isoelektrischen Punkte der beiden monoklonalen Antikörper wird ein Gerät zur isoelektrischen Dünnschicht-Gelfokussierung AB, (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemical AB, Schweden) verwendet. Die Messung wird unter Verwendung von Pharmalite pH3–10 (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemical AB, Schweden) und als Trägermittel Ampholite in Übereinstimmung mit dem Verfahren von Awdeh, u. a. (Nature, **219**, S. 66 [1980]) vorgenommen. Es wurde gefunden, daß monoklonaler Antikörper HII7C und monoklonaler Antikörper HIII2F isoelektrische Punkte von 6,7 bis 7,0 bzw. 6,2 bis 6,5 haben.

Schritt 10

(Herstellung von an monoklonale Antikörper gebundenen Harzen)

50 ml der wäßrigen Lösung, die 150 mg in Schritt 6 gewonnenen monoklonalen Antikörper HII7C enthält, werden gegen eine 0,5 M NaCl und 0,1 M Natriumcarbonat enthaltende wäßrige Lösung dialysiert. Die dialysierte Antikörperlösung wird zu 50 ml gequollenem und durch Cyanogenbromid aktiviertem Harz Sepharose CL-4B (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemical AB, Schweden) gegeben. Das Gemisch wird über Nacht leicht bei 4°C zur Herbeiführung der Reaktion gerührt. Nach Beendigung der Reaktion werden die Harze ausreichend mit einer wäßrigen Lösung, die 0,5 M NaCl und 0,1 M Natriumcarbonat enthält, gewaschen. Danach werden die Harze mit 50 ml 1 M wäßrigem Ethanolamin vermischt, worauf 2 Stunden lang leichte Bewegung bei Raumtemperatur folgt, um dadurch nicht umgesetzte aktive Gruppen zu schützen. Anschließend werden die Harze ausreichend mit wäßrigem 8 M Harnstoff und physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, um an monoklonalen Antikörper HII7C gebundene Harze für die Verwendung als Adsorptionsmittel bei der Affinitäts-Chromatographie zu gewinnen. Im wesentlichen werden die gleichen Verfahrensweisen wie oben wiederholt, um an monoklonalen Antikörper HIII2F gebundene Harze zu erzielen.

An monoklonalen Antikörper HII7C gebundene Harze werden in eine Säule (2,5 × 8 cm) gefüllt.

Beispiel 1

In Bezugsbeispiel 3 hergestellte, Plasmid pHTNF-lacUV5-1 enthaltende *E. coli* werden in einer herkömmlichen Weise gezüchtet, und danach werden die Zellen gesammelt. Die Zellen werden in 210,02 M Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 7,8) lysiert, um dadurch einen den Human-TNF enthaltenden Zellextrakt zu gewinnen. Der Extrakt besitzt eine Aktivität von $5,2 \times 10^5$ U/ml und enthält Human-TNF mit einer spezifischen Aktivität von $4,2 \times 10^4$ U/mg.

Zu dem Extrakt wird Streptomycin in einer solchen Menge gegeben, daß eine endgültige Konzentration von 0,7 M/V% erzielt wird, um ein Präzipitat von Nucleinsäure zu erzeugen. Nach Entfernung des Präzipitats durch Zentrifugieren wird die überstehende Flüssigkeit auf eine Säule von DEAE-Sepharose CL-B (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemical AB, Schweden) aufgegeben, die mit 0,02 M Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 8,0) äquilibriert wurde. Die Säule wird mit dem gleichen Puffer gewaschen, und danach erfolgt die Eluierung unter Verwendung von 10 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,5), der 0,1 M Natriumchlorid enthält, als Eluierungsmittel, um eine rohe Lösung (A) mit einer spezifischen Aktivität von $3,90 \times 10^5$ U/mg zu erhalten.

Nach der Einstellung des pH-Wertes mit Chlorwasserstoffsäure auf 6 wird die Rohlösung (A) auf eine Säule von Blue Sepharose CL-6B (hergestellt und vertrieben von Pharmacia Fine Chemical AB, Schweden) aufgegeben, die mit 10 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 6,0), der 0,1 M Natriumchlorid enthält, äquilibriert wurde. Die Säule wird ausreichend gewaschen und anschließend erfolgt die Eluierung unter Verwendung von 10 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 8,0), der 0,5 M Natriumchlorid enthält, als Eluierungsmittel, um eine einen gereinigten Human-TNF enthaltende Fraktion zu gewinnen. Von dem Extrakt, der durch Entfernung der Nucleinsäure gewonnen überstehenden Flüssigkeit, der Rohlösung (A) und der durch erfindungsgemäße Säulenchromatographie erzielten Fraktion werden die spezifische Aktivität, die Rückgewinnung und der Reinigungsgrad nach den oben erläuterten Verfahren bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 enthalten.

Vergleichsbeispiel 1

Die in Beispiel 1 erzeugte Rohlösung (A) wurde unter Einsatz einer Säule von monoklonalem Antikörper gereinigt.

Bei der hier verwendeten Säule von monoklonalem Antikörper handelt es sich um die Säule mit dem an den monoklonalen Antikörper gebundenen Harz, das nach Bezugsbeispiel 4 hergestellt wurde und in die Säule eingefüllt wird. Die Säule wird mit 50 mM Phosphatpuffer (pH-Wert 7,5), der 0,15 M Natriumchlorid enthält, äquilibriert, und danach wird auf die Säule die Rohlösung (A) aufgegeben. Nach gründlichem Waschen erfolgt die Eluierung unter Verwendung von 0,1 M Glycin-Natriumchlorid (pH-Wert 10,0) als Eluierungsmittel, um eine einen gereinigten Human-TNF enthaltende Fraktion zu gewinnen. Die auf diese Weise gewonnene Fraktion wird für Bestimmungen der spezifischen Aktivität, der Rückgewinnung und des Reinigungsgrades nach oben genannten Verfahren herangezogen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammen mit den in Beispiel 1 erzielten Ergebnissen enthalten.

Beispiel 2

Im wesentlichen werden die gleichen Verfahrensweisen wie in Beispiel 1 wiederholt, nur werden Matrix Gel Red A und Matrix Gel Red B (jeweils hergestellt und vertrieben von Amicon Co., Ltd., USA) getrennt anstelle von Blue Sepharose CK-6B verwendet, um dadurch einen gereinigten Human-TNF enthaltende Fraktionen zu gewinnen.

Die auf diese Weise gewonnenen Fraktionen werden für Bestimmungen der spezifischen Aktivität, der Rückgewinnung und des Reinigungsgrades nach den oben erläuterten Verfahren herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammen mit den in Beispiel 1 erzielten Ergebnissen enthalten.

Tabelle 6

Schritt	Spezifische Aktivität (U/mg)	Rückgewinnung (%)	Reinigungsgrad (Mal)
Kulturextrakt	$4,2 \times 10^4$	100	1,0
Nach Entfernung von Nucleinsäuren	$4,8 \times 10^4$	76	1,1
Nach Behandlung mit DEAE-Sepharose (Rohlösung (A))	$3,9 \times 10^5$	65	9,3
Nach Behandlung mit Blue Sepharose CL-6B	$1,5 \times 10^6$	63	35,7

Tabelle 7

Schritt	Spezifische Aktivität (U/mg)	Rückgewinnung (%)	Reinigungsgrad (Mal)
Rohlösung (A)	$3,9 \times 10^5$	100	1,0
Nach Behandlung mit Blue Sepharose CL-6B	$1,5 \times 10^6$	90	3,8
Nach Behandlung mit monoklonaler Antikörpersäule	$1,4 \times 10^6$	55	3,6

Tabelle 8

Schritt	Spezifische Aktivität (U/mg)	Rückgewinnung (%)	Reinigungsgrad (Mal)
Rohlösung (A)	$3,9 \times 10^5$	100	1,0
Nach Behandlung mit Blue Sepharose CL-6B	$1,5 \times 10^6$	90	3,8
Nach Behandlung mit Matrex Gel Red A	$1,4 \times 10^6$	85	3,6
Nach Behandlung mit Matrex Gel Green A	$1,4 \times 10^6$	80	3,6

FIG. 1

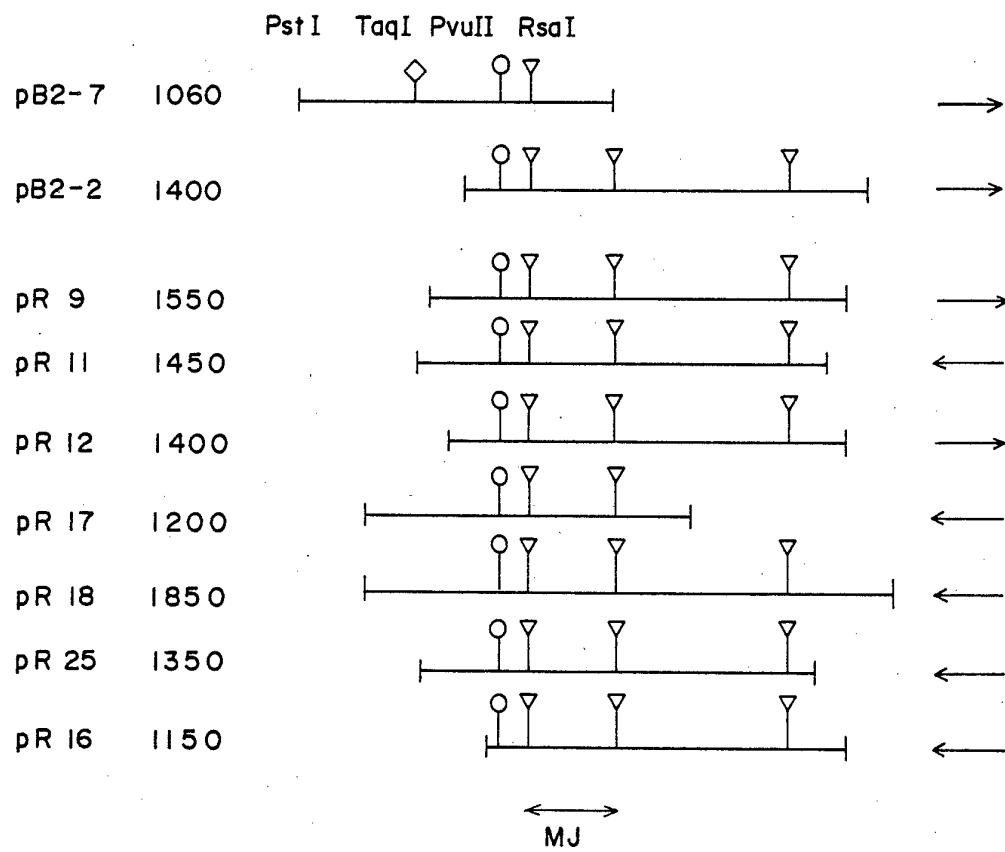


FIG. 2

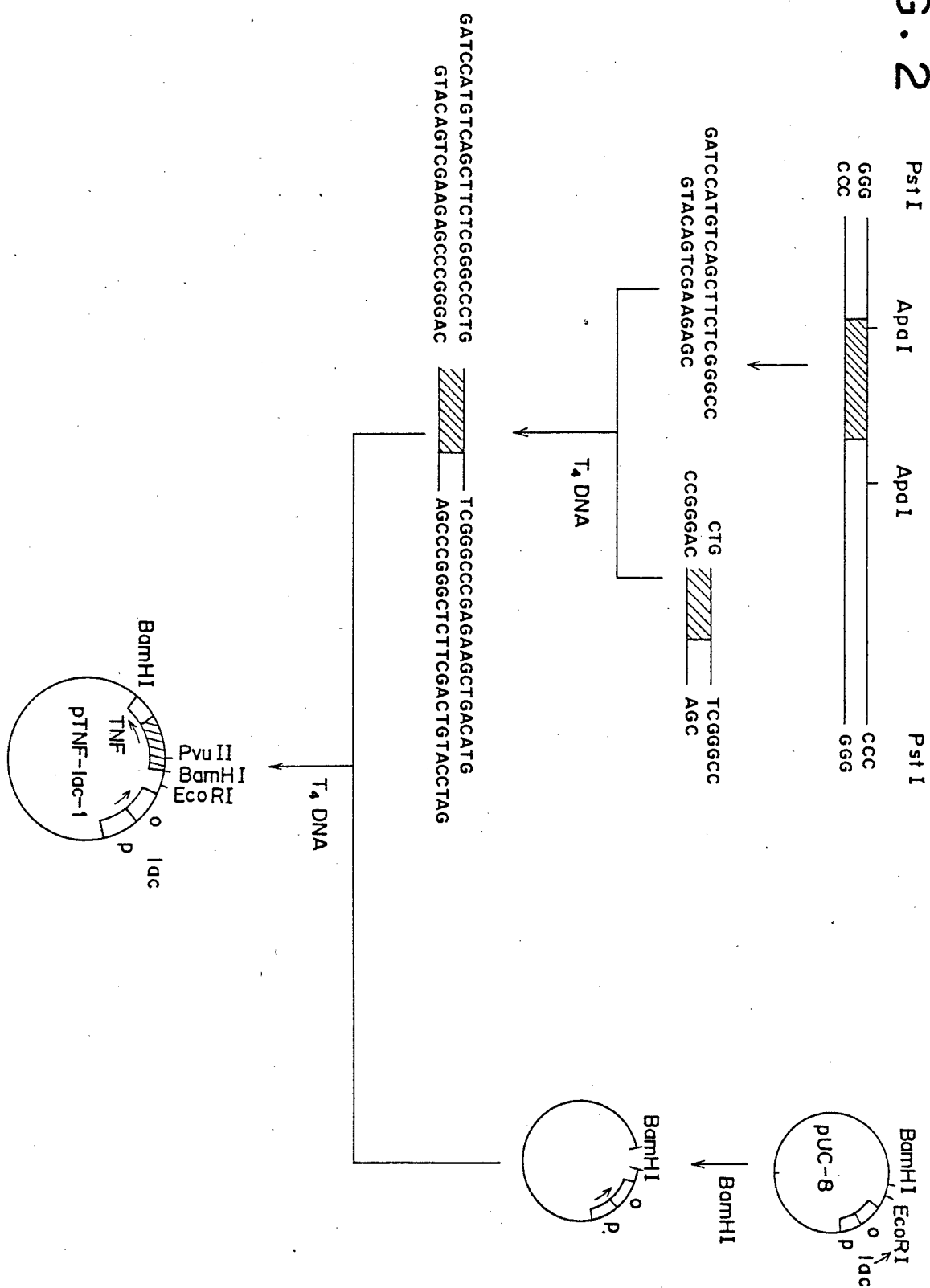


FIG. 3

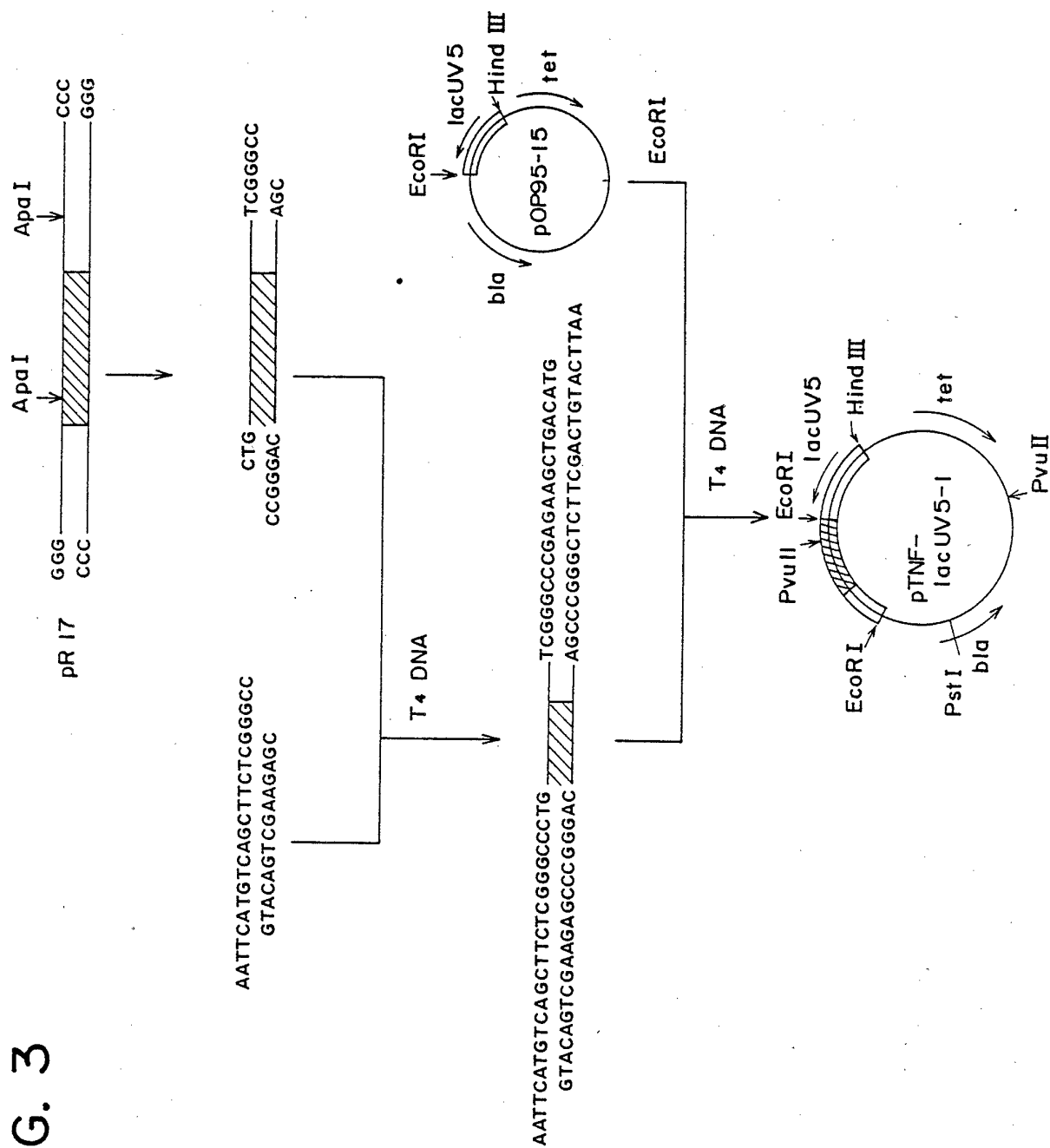


FIG. 4

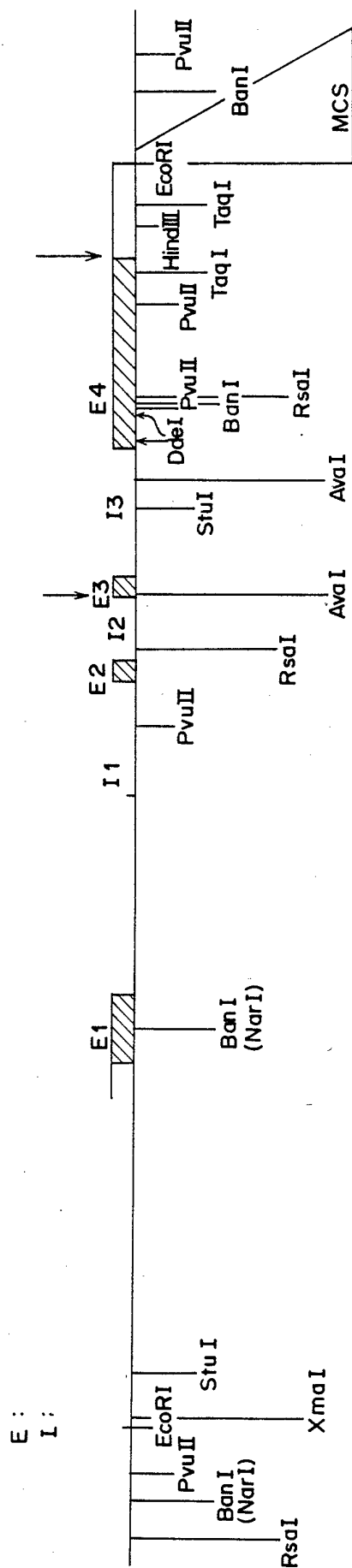


FIG. 5

E :
I :

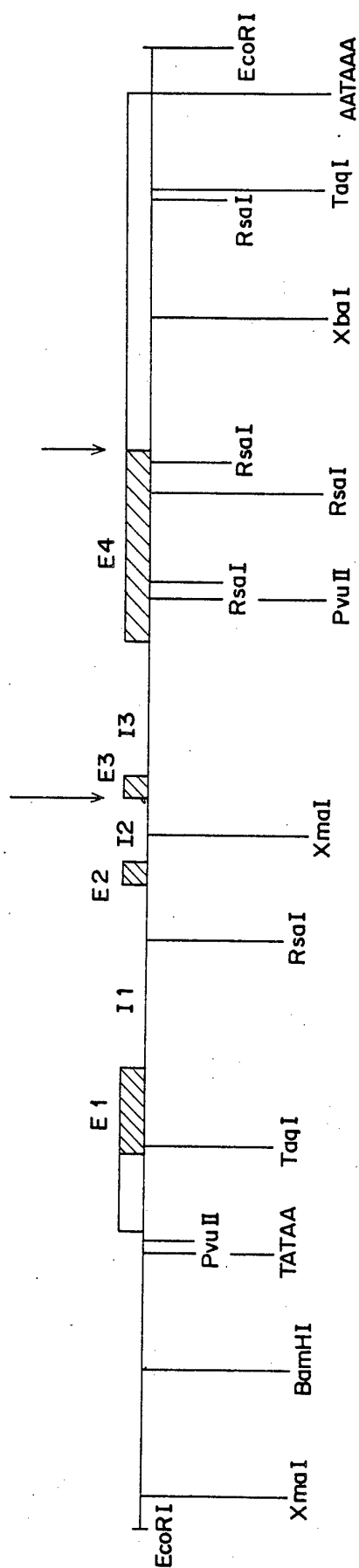


FIG. 6

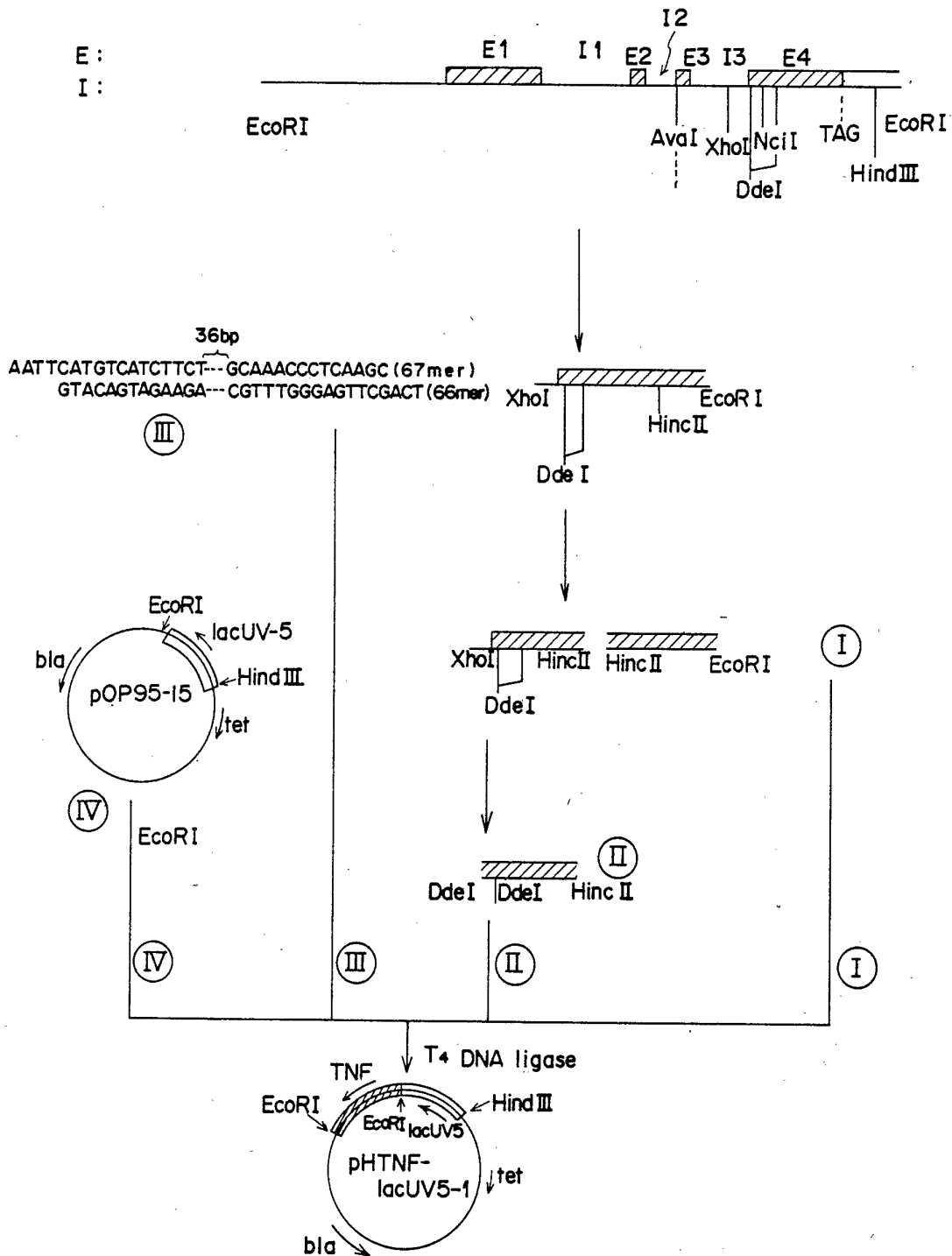


FIG. 7

