РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG (11) 60238B2

5(51) C 12 N 15/00

ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ ЗА ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 75334
(22) Заявено на 13.06.86

Приоритетни данни
(31) 661026 (32) 15.10.84 (33)US
(31) 670360 (32) 09.11.94 (33)US
(31) 730696 (32) 02.05.85 (33)US
(31) 760661 (32) 30.07.85 (33)US

(41) Публикувана заявка в бюлетин № на
(45) Отпечатано на 31.01.94
(46) Публикувано в бюлетин № 1 на 14.01.94
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег.

(73) Патентопритежател(и):
Cetus Corp., Emeryville, CA (US)

(72) Изобретател(и):
David Fu-Chi Mark, Danville, CA (US)
Martha Ballie Ladner, Richmond, CA (US)
Leo Shun Lin, Fremont, CA (US)
Alice Ming Wang, Walnut Creek, CA (US)
Abla Abu-Zayyad Creasey, Piedmont, CA (US)
Janelle Noble Van Arsdell, Richmond, CA (US)

(74) Представител по индустриална собственост:

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/US85/01921, 03.10.85
(87) № и дата на PCT публикация:
WO86/02381, 24.04.86

(54) ЧОВЕШКИ ТУМОРНЕКРОТИЗИРАЩ ФАКТОР

(57) Човешкият тумornекротизиращ фактор (TNF) намира приложение в медицината. TNF и мутантните белтъци (мутеини) са с N-крайни делеции и с по-висока биологична активност. TNF се получава чрез рекомбинантни методи, като човешка промиелоцитна левкемична клетъчна линия се индуцира чрез подобрен метод и TNF се пречиства до хомогенност. Прилагат се методи, вектори и клетки, необходими за получаването на човешки TNF в количества, достатъчни за практическо приложение.

19 претенции, 8 фигури

BG 60238 B2

(54) ЧОВЕШКИ ТУМОРНЕКРОТИЗИРАЩ ФАКТОР

Област на техниката

Изобретението се отнася до рекомбинантно получаване на човешки белтъчни фактори, по-специално до продуцирането на белтък, който е селективно токсичен за тумори, както и за негови заместители - мутантни белтъци /мутеини/, които са с подобрена специфична активност.

Предшестващо състояние на техниката

Факторът, известен като тумор некротизиращ фактор /TNF/, е открит за първи път от Карсвел и сътр., лит.източник /1/. Установено е, че серумите на третирани с ендотоксични мишки, зайци или плъхове, които са били предварително сенсибилизирани с имунопотенциатор, например Bacillus Calmehe-Gurin / BCG/, съдържат вещество, което при инжектиране в мишки с трансплантирани тумори, предизвиква интензивно разрушаване на туморите без нежелани странични ефекти за реципиента. Предполага се, че серумите съдържат вещество, което селективно действа некротично на туморните клетки и е неутрално спрямо нормалната тъкан, поради което е означено като TNF. Способността да предизвиква това селективно разрушаване на туморите при инжектиране в животни е стандарт за анализ in vivo за определяне на TNF.

TNF се продуцира и в клетъчна култура. Матюйс и сътр. /2/ получават TNF активност от среда на мононуклеарни фагоцити, получени от инжектирани с BCG зайци. Манел и сътр. / 3/ получават TNF активност от среда на обогатени с макрофаги перитонелни жлезисти клетки от инжектирани с BCG мишки, след като клетъчната култура е индуцирана с ендотоксин.

Факторът, отговорен за селективната цитотоксичност срещу неоплазмени клетки, се пречиства, но тъй като тези вещества са в незначителни количества в серума на животните или в среда от тъканна култура, пълното пречистване не е осъществено. Също така, белтъкът или белтъците са нестабилни. В два патента на US №4,447,355 и № 4,457,916 са описани методите за стабилизиране активността на препаратите чрез добавянето например на албумин или въглехидрати. Чрез методите, описани в тези и други патенти, използващи стандартни техники за пречистване, е възможно получаването на TNF препарати със специфична активност средно $1x10^6$ единици/мг, като единиците се определят чрез in vitro анализ за цитотоксичност срещу миши L-M клетки /ATCC CCL 1.2/. Не се получава обаче материал, който да е активен при in vivo анализ за туморна некроза / Carswell/ на TNF и да е достатъчно пречистен за определяне на неговата аминокиселинна последователност.

Поради сегашната липса на чист цитотоксичен белтък все още не е ясно колко белтъци предизвикват селективна некроза на ракови клетки. In vivo методът на Carswell се приема за стандарт за определяне на TNF. Поради междувидова активност на тези фактори този анализ отчасти е удобен за диагностика. Обаче по-удобният за изпълнение in vitro анализ за цитотоксичност е използва по-често като индекс за TNF активност въпреки значителните грешки и липсата на корелация между in vitro анализа и теста за определяне на TNF. Получен е белтък от трансформирана B-клетъчна линия, който е активен в in vitro анализ и е означен като "лимфотоксин", след като е пречистен до хомогенност и частично секвениран /Genenthech, EPO патентна публикация 0100641, публикувана 15.02.1984/ . Прието е, че лимфотоксинът е различен белтък от TNF, тъй като той няма макрофагов произход. Също така антисеруми, получени срещу лимфотоксин, не показват кросреакция с цитотоксичния TNF фактор, пречистен от макрофаги /4/.

Намирането на определена белтъчна последователност с цитотоксичен ефект, специфично насочен срещу туморни клетки, би било от несъмнена полза за диагностиката и терапията на злокачествените заболявания. Вероятно е някои от тези фактори да показват и антипаразитна активност. Установено е, че белтък, означен като TNF, получен от серума на инжектирани с BCG мишки, показва цитотоксични ефекти спрямо маларийни паразити /Plasmodium falciparium/ in vivo и in vitro /5/.

Техническа същност на изобретението

Известно е, че човешка промиелоцитна левкемична клетъчна линия /HL-60, ATCC № CCL 240/ при подходяща индукция продуцира

BAD ORIGINAL

тумор некротизиращ фактор в значителни количества. Факторът се пречиства, секвенира и продуцира чрез рекомбинантни методи. Така за първи път е получен химично определен фактор, който е избирателно цитотоксичен спрямо човешки туморни клетки. Това дава възможност да бъдат получени значителни количества от този материал за терапия, за направа на програмирани модификации за повишаване на активността и за получаване на подходящи диагностични тестове за откриване на тумори в даден организъм, т.е. наличието на рекомбинантен източник на този белтък представлява възможност за манипулиране на този полезен пептид за целите на терапията и диагностиката. Докато най-малко една форма на TNF се продуцира естествено в човек в отговор на образуването на тумор, но без гъвкавостта, количеството и качеството, които биха се осигурили от неговото рекомбинантно получаване, то без неговото получаване по рекомбинантен път полезните му свойства биха били неизползваеми.

Изобретението се отнася до рекомбинантен човешки TNF и до непрекъсната ДНК последователност, кодираща този белтък, до последователности, позволяващи нейната експресия, до вектори за трансформация, които прехвърлят на трансформираните гостоприемници способността да експресират TNF, до така трансформираните гостоприемници и до методите за получаване на различните състави на изобретението.

Изобретението се отнася до белтък, чиято аминокиселинна последователност се кодира от ДНК последователност, представена на фиг. 1, специфично в гликозилирани и негликозилирани форми.

Изобретението също се отнася до няколко специфични рекомбинантни мутантни форми на TNF /мутеини/, съдържащи промени в първичната структура в сравнение с тази, показана на фиг.1, и до методите и материалите за тяхното получаване. Тези мутеини са със съпоставима, или по-висока активност по отношение способността селективно (избирателно) да убиват туморни клетки в сравнение с TNF, притежаващ първична структура, представена на фиг.1 /mNTF/. Тези мутеини включват съответни белтъци, съдържащи делеции в 1-10 N-терминалните аминокиселинни остатъци и мутеини без цистеин, при които липсват 1-10 N-терминалните аминокиселини.

Изобретението се отнася и до белтък с N-терминална последователност: Bal-Arg-Ser-Arg-Tre-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-Val-Ser-Val-Ala-Asn-Pro-(Gln)-(Ala)-Glu-Gly и за подобрени методи за индуциране продукцията и пречистването на тази аминокиселинна последователност от промиелоцитни левкемични клетки. Изобретението също се отнася до фармацевтични състави, съдържащи TNF, до методи за (лечение) приложение чрез използването на тези състави и до подобрен метод за анализ на TNF.

Описание на приложените фигури.

Изобретението се пояснява с приложените фигури, от които:

фигура 1 представлява нуклеотидна последователност на pE4 и съответната аминокиселинна последователност на човешкия TNF;

фигура 2 - рестриктазна карта на инсерта в pE4;

фигура 3 - плазмиди за експресия и олигомери за тяхното конструиране за различни TNF мутеини.

фигура 4 - сравнителни специфични активности на няколко TNF мутеини.

фигура 5 - SDS-гелове, съдържащи пречистени рекомбинантни /TNF/pTNF/ мутеини;

фигура 6 - резултатите от локализацията на /pTNF/ мутеини на изоелектрично фокусиращи гелове;

фигура 7а и 7б - резултатите от in vivo тестуване на TNF активност в туморни мишки.

Определения

Изразът "тумор некротизиращ фактор" TNF се отнася до аминокиселинна последователност, еквивалентна изцяло на тази от фиг. 1 и притежаваща селективна цитотоксичност срещу туморни клетки. За да отговаря на така представената дефиниция, аминокиселинната последователност трябва да бъде активна при in vitro анализ за цитотоксичност на базата на използването на миша клетъчна линия от съединителна тъкан L-929, както е описано по-долу. Очевидно е, че това определяне на TNF активността не е абсолютно същото, както описаното по-горе по Carswell/Supra/. Въпреки това активността, определена чрез in vitro анализ за цитотоксичност срещу човешки

BAD ORIGINAL

туморни клетки, представлява достатъчно доказателство за откриването на тумор некротизиращ фактор чрез този анализ. Както е показано по-долу. Цитотоксичността срещу L-929 също така се изразява и спрямо други човешки тумори. Подобно припокриване между факторите, които са активни в специфичния анализ за цитотоксичност и in vivo анализа, създаден от Carswell, е очаквано и напълно естествено.

Съгласно изобретението в зависимост от pH на средата, ако TNF белтъкът е суспендиран или е в разтвор, или ако неговата среда е в твърда форма, когато е кристализиран или утаен, той може да бъде във вид на фармацевтично приложими соли или да е в неутрална форма.Свободните аминогрупи на белтъка могат да образуват соли например с неорганични киселини като солна, фосфорна или сярна киселина, или с органични киселини, например оцетна, гликолова, янтарна или бадемова киселина. Свободните карбоксилни групи могат да образуват соли с основи, както неорганични - натриева, калиева или калциева основа, така и органични основи, като пиперидин, глюкозамин, триметиламин, холин и кафеин. Също така протеинът може да бъде модифициран чрез комбиниране с други биологични материали, като липиди и захариди, или чрез модификации на страничните вериги като ацетилиране на аминогрупи, фосфорилиране на хидроксилни остатъци или окисление на сулфидрилни групи. Всички тези модификации се включват в границите на определението, докато се запазва TNF активността.

Съгласно изобретението определени модификации в първичната аминокиселинна последователност могат да доведат до белтъци с еквивалентна или засилена активност спрямо последователността, представена на фиг. 1. Тези модификации могат да бъдат направлявани например чрез сайт насочена мутагенеза, или случайни - чрез мутации в клетките продуценти на TNF. Тъй като не може да се очаква, че дадена модификация ще доведе до белтък с TNF активност, и тъй като не може да се предскаже предварително кои модификации са приемливи, всички тези модификации се включват в определението за TNF, доколкото TNF активността, както погоре бе определена, се запазва.

По-нататък се пояснява, че мутеини, в които липсват, или има промени в първите 10 аминокиселини от N-края на секвенцията от фиг. 1, имат подобна или по-голяма специфична активност в сравнение с тази на TNF, чиято структура е показана. Моделът на специфичната активност следва камбановидна крива с оптимална активност при делецията на 6-8 N-терминални аминокиселини. Съответно дефиницията на TNF специфично включва тези съкратени форми, тъй като делеции от 10 аминокиселини от N-края не разрушават, а обратно-често увеличават биологичната активност.

Следователно дефиницията за TNF тук специфично включва белтъци с аминокиселинна последователност, напълно еднаква с тази от фиг. 1, но при които липсват 1-10 аминокиселините от N-края на посочената секвенция. В лит. източник /6/ Shirai, et al., е описано получаването на рекомбинантен TNF, като се използва експресионен вектор, конструиран от ДНК, получена от човешка геномна банка. В тази конструкция кодираният белтък няма първите две аминокиселини от N-терминалната последователност от фиг. 1. По неясни причини, но вероятно във връзка със структурата на заешкия геномен TNF, Shirai, et, al считат, че истинският N-край започва от позицията, показана в описанието съгласно изобретението като позиция 3, и така конструират и съответния вектор. В следствие на това продуцираният от Shirai TNF има N-терминална последователност Ser-Sev-Ser-Arg-Thr и т.н. Продуцираният от Shirai TNF има in vivo активност. Директно сравняване на активността на този белтък с тази на рекомбинантно полученият uTNF и TNF мутеините, представени тук, до сега не е извършвано.

В допълнение, делеции от C-края на TNF от фиг.1 също са безвредни. Направени са конструкции на гени, съдържащи до 17 аминокиселинни делеции.

Патентът на US 4,518,584 показва безцистеинови мутеини на биологично активни белтъци. При TNF неутрални аминокиселинни замени на цистеина от позиция 69 водят до активни TNF белтъци. В даден случай цистеина от позиция 101 също може да отсъства, затова бяха изготвени мутеини, съдържащи редуващи се неутрални амино-

BAD ORIGINAL

киселини в тази позиция,както и мутеини, при които и двата цистеина 69 и 101 са заменени. Тези мутеини могат също да бъдат модифицирани съгласно представения в изобретението метод за получаване на съкратени форми, които запазват TNF активността и могат да имат увеличена специфична активност in vitro или in vivo. Тези мутеини не съдържат 1-10 аминокиселините на N-края, аминокиселинни последователности на C-края, или и двете заедно. Тези мутеини също се обхващат от определението за TNF

След това се конструират гени на базата на пречистен от естествени източници TNF, като гени, кодиращи мутеини, при които два серинови остатъка от позициите 3 и 4 се делетират, и мутеин, при който his-val двойката от позиции 15 и 16 се заменя с val-ser.

За да се означи по-ясно, белтъкът с аминокиселинната последователност, номерирана от 1-157 на фиг. 1, се използва за сравнение и се означава, макар и спорно, като mTNF /зрял TNF/. Всички други аминокиселинни последователности, хомоложни на mTNF и показващи TNF биологична активност, се означават като "мутеини" на mTNF и се представят съобразно разликите им спрямо mTNF чрез използване на номерацията на аминокиселинните остатъци, представени на фигурата. Например мутеини, които имат заместен цистеин в позиция 69, ще бъдат означени чрез използване на заменения остатък и позиционния номер т.е. пептиди със серин вместо цистеин в позиция 60 се означават като Ser_{69} TNF. Ако даден остатък липсва, се означава като des остатък, например мутеинът, при които серините от позиция 3 и 4 са делетирани , се означава като $Des\text{-}Ser_3Des\text{-}Ser_4$ TNF. Мутеини, при които липсват сегменти от аминокиселини от N- или от C-края, се означават съобразно края, който е засегнат. Делеции в N-края ще бъдат представени като след знака Δ се изписва броят на липсващите аминокиселини. Например мутеини, при които липсва една N-терминална аминокиселина в сравнение с белтъка от фиг. 1, се означават като Δ 1TNF. За делеции в C-края знакът Δ е последван от номера на последния останал остатък и знака минус. Например мутеинът, при който 7 аминокиселини са премахнати от C-края, се означава като Δ 150-TNF. Когато има комбинации от по-горе споменати промени, означението показва всички пормени н-р Δ $1Des\text{-}Ser_3Des\text{-}Ser_4Ser_{69}$ Δ 150-TNF.

Не всички мутеини на mTNF са получени нарочно и по рекомбинантен път. Наистина при сравняване на последователността, получена за 22N-терминалните аминокиселини на секретирания от HL-60 TNF, представен по-долу, със съответния участък от последователността от фиг. 1 се виждат малки модификации в първичната структура, въпреки че и двата белтъка показват TNF активност. Представената на фигурата последователност има допълнителна двойка от серинови остатъци след серина от позиция 3, след което следва хомоложен участък, обхващащ позиции 4-12 от белтъка, получен от HL-60 и позиции 6-14 от последователността от фигурата. В допълнение позициите 13 и 14 при HL-60 получения белтък са Vel-Ser, докато съответните позиции 15 и 16 от последователността от фигурата са His-Val.

"Оперативно свързани" е термин, означаващ такова разположение на компонентите, което осигурява тяхното нормално функциониране. Така контролни секвенции, "оперативно свързани" към кодиращи последователности, са способни да предизвикат експресията на кодиращата последователност.

"Контролни секвенции" означава ДНК последователност или последователности, които, когато са правилно свързани към желаната кодираща секвенция са способни да предизвикат нейната експресия в гостоприемници, съвместими с подобни последователности. Такива контролни последователности включват промотори както в прокариотни, така и в еукариотни гостоприемници, и в прокариотните организми също включват последователности за сайт-рибозомно свързване, а при еукариотите-терминални сигнали. Допълнителни фактори, необходими или полезни за изразяване на експресията, също могат да бъдат известни. Както се използва в описанието на изобретението " контролни последователности" означава всякаква ДНК последователност, необходима за ефективната експресия в съответния гостоприемник.

"Клетки" или "рекомбинантни гостоприемници" или "клетки гостоприемници" са

BAD ORIGINAL

взаимнозаменяеми понятия съгласно описанието на изобретението. Тези термини включват както самите третирани клетки, така и тяхното поколение. Естествено не цялото поколение е идентично на родителските клетки, което се дължи на случайни мутации или разлики в средата. Затова такива променени потомства също се включват при използване на горните термини.

Б. Общо описание

Описаните по-долу методи за получаване на ДНК последователност, кодираща човешки TNF, са пояснителни и са типични. Възможно е да има и да могат да бъдат използвани и други подходи. Тъй като цялата ДНК последователност се получава без интрони и е пояснена в описанието, то не е необходимо да се повтори този процес за получаване на желаната ДНК последователност. Също така не е необходимо да се използват същите системи за експресия, които са пояснени в описанието. Както е пояснено по-долу, съществуват най-различни гостоприемници и контролни последователности, които могат да се използват за ефективна продукция на желания TNF.

Съгласно изобретението човешката промиелоцитна левкемична клетъчна линия HL-60 се индуцира да секретира TNF чрез подобрена процедура за индуциране, както е описано в точка В. 1 по-долу. Този белтък се пречиства до хомогенност чрез използване на нов метод за пречистване, както е описано в т. В.2., и полученият пречистен белтък се подлага на аминокиселинно секвениране. Конструират се експериментални смеси, които след това се използват за получаване на подходящи кодиращи последователности, както е описано в т. В.3. Кодиращите последователности се използва за експресия чрез лигирането им с вектори, съдържащи подходящи прокариотни контролни системи, както и чрез използване на вирусни промотори за експресия в клетки на бозайници.

В кодиращата последователност се извършват модификации, за да се получат мутеини от ДНК последователностите, получени от сДНК банки. Такива модификации се предизвикват от праймер насочена мутагенеза и най-общо водят до по-къси форми на TNF, показващи нараснала активност.

В.1. Подобрена процедура на индукция. Клетъчната линия, подлежаща на индуциране - HL-60 човешка промиелоцитна левкемична клетъчна линия, е относително недиференцирана. Ако й се даде възможност да се диференцира, тя би продуцирала колонии от по-специфично дефинирани клетъчни типове. В зависимост от условията, тя може да "узрее" в гранулоцити или в моноцити, които впоследствие могат да се диференцират в макрофаги. Приема се, че макрофаговата фракция е отговорна за in vivo продукцията на TNF. От друга страна, приема се, че тясно свързаният лимфотоксин се продуцира в В лимфоцитни клетки.

Нивото на продуцирания TNF от съответните клетки може да бъде 10-20 пъти повишено чрез подобряване на процедурата за индуциране. При известната процедура, описана от Gifford /7/, се използва третиране с форболов естер 12-0-тетрадеканоилфорбол-13-ацетат /TPA/ при концентрация 10 мкг/мл за 30 мин при 37°С в 20% серум. След това клетъчните култури се центрофугират и третират с ендотоксина при концентарция 10 мкг/мл в без серумна среда, съдържаща трансферин и инсулин /по 10 мкг/мл/. След понижаване на концентрацията на форболовия естер до 100 кг/мл при началото на инкубацията с безсерумната среда и след добавяне на 10 мкМ калциев йонофор А23817 при третирането с ендотоксина концентрацията на TNF в супернатантната значително нараства след индукцията с ендотоксин.

В.2. Пречистване на TNF.

Прилага се подобрен метод за пречистване на TNF от индуцирани тъканни култури. Този метод представлява обработка на супернантната, съдържаща TNF анионообменна смола при условия, непозволяващи адсорбцията на TNF, последвано от обработка на TNF съдържащите фракции с калибриращ гел до получаване на активните фракции, които се разделят на SDS-полиакриламидна гел електрофореза /PAGE/. Фракцията, съдържаща TNF от SDS-PAGE, впоследствие се пречиства чрез високо афинитетна течна хроматография /ВАТХ/.

В първия етап супернатантата, съдържаща TNF, по избор може да се концентрира преди използването на анионнообменната смола, като за целта се използва достъпният на пазара концентриращ филтър, като Amicon

BAD ORIGINAL

кухи фибри или милипорова мембранна ултрафилтрираща единица. Концентратът се третира с подходяща анионнообменна смола, например DEAE агароза, DEAE целулоза, QAE агароза, като DEAE агарозата се предпочита. Условията на обработка не позволяват TNF активността да се адсорбира от смолата - т.е. pH на разтвора е около 7-9 и общата солева концентрация е приблизително 0,01-0,07 М.

След това несвързаните фракции се пречистват чрез гелфилтрация, като се използват всякакви търговски калибриращи гелове, например Sephadex G-75 Superfine / Pharmacia/, който има пропускливост на молекули с мол. тегло около 70000 далтона. След третиране с гела фракциите, съдържащи TNF, се подлагат на SDS-PAGE при подходящи условия и се изрязва областта от гела, съдържаща TNF активност, SDS-PAGE де извършва по метода на Laemmli /8/ и представлява широко използван метод. Вариации на специфични условия в подходящи граници е естествено да се прилагат в процеса на работа.

Активните фракции от SDS-PAGE се подлагат на обратнофазова ВЕТХ и се елюират с 0-60% градиент на ацетонитрил в 0,1% трифлуороцетна киселина /TFA/. Други градиентни системи, които могат да се използват, са оцетна киселина и н-пропанол.

Така полученият човешки TNF е достатъчно чист, за да се подложи на N-крайно аминокиселинно секвениране.

В.3. Изолиране на кодиращата последователност иРНК се изолира от HL-60 клетки и се добавя към стандартна овоцитна система за транслация, като предизвиква синтеза на TNF-фактор, който е активен в L-929 анализа за цитотоксичност. Относителната ефикасност на олигомерни проби се тестува по тяхната способност при преинкубация с иРНК сместа да повлиява негативно на TNF продукцията в тази транслационна система /"хибриден арест"/. Този критерий може по-задълбочено да се използва чрез радиоавтография на иРНК градиенти, хибридизирани към киназирани проби, където желаната иРНК кодираща за TNF е предварително идентифицирана чрез транслация на фракциите в овоцитната система. Така е възможно да се определи коя от четирите смеси, всяка от които съдържа по шестнадесет 14-мера, конструирани, за да бъдат комплементарни на иРНК, кодираща последователност Asp-Lys-Pro-Val-Ala в белтъка, съдържа правилната последователност. След като се установи чрез Northern blots-техниката, че и тази смес от шестнадесет олигомери не хибридизира достатъчно специфично с TNF-кодиращата иРНК, тези експерименти на "хибриден арест" бяха повторени чрез използване на осем двойки от 14-мери. Една от тези двойки хибридизира специфично с иРНК.

След като се изолира достатъчно специфична проба, тя се използва за скриниране на сДНК /банка/, получена от фракцията на иРНК, кодираща за желания TNF. Изолират се 28 колонии, които показват хибридизация, от тях се изолира плазмидна ДНК и няколко инсерта се секвенират. Плазмиден препарат, съдържащ цялата кодираща последователност и означен като pE4, се използва като източник за кодиращата последователност. Друг плазмиден препарат pB11 се използва за експресия при бозайници.

В.4. Експресия на TNF. Определянето на първичната структура на инсерта на pE4 позволява да се локализира кодиращата последователност и наличните в инсерта рестрикционни сайтове. Въпреки, че хомологията не пълна, лесно се осъществява правилното подреждане. За по-лесно манипулиране желателно е да се постави ATG начален кодон в правилна посока за четене, непосредствено преди кодона на N-крайната аминокиселина на зрялата белтъчна последователност, както и да се включи HindIII сайт, непосредствено над ATG кодона. Това се осъществява чрез сайт-насочена мутагенеза, както е описано по-долу. По този начин е възможно изрязването на кодиращата последователност с подходящия стартов сигнал на две части- HindIII/PstI фрагмент и PSTI/BamHI фрагент и вмъкването на тези фрагменти експресионни вектори, съдържащи контролни последователности. Алтернативно цялата последователност може да бъде изрязана като HindIII фрагмент. Използваните тук експресионни вектори са pTRP3, съдържащ trp промотор над HindIII сайта и BamHI сайт под HindIII сайта; и pFC54.t и pPLOP, които съдържат P_L промотора в подобно разположение.

BAD ORIGINAL

Тези експресионни вектори се трансформират в подходящи гостоприемници E.coli, и получените трансформанти се култивират при условия, позволяващи продуктцията на TNF. TNF може да се изолира от клетките след обработка с ултразвук, след като пробата се обработва с хаотропен агент, който разтваря желания TNF, или третираната вече с ултразвук смес може директно да се анализира.

Началната експресия се извършва в E.coli, но, както е описано в С.1 по-долу, кодиращата секвенция от pE4 или pB11 може също да бъде лигирана към контролни последователности, подходящи за експресия в други прокариоти, в дрожди, в тъканни култури, или дори в растителни клетки. Експресията в клетки на бозайници се извършва чрез SV40 промотора на pB11. Избирането на подходящ гостоприемник зависи от различни фактори, включително способност да секретират, протичане на постранслационен процеси и способност да продуцират голямо количество от желания белтък при подходящи условия на растеж.

B.5. Анализи. B.5.a. Анализ за цитотоксичност. L-929 системата за анализ е подобрена, подходяща in vitro, позволяваща бързо определяне на TNF активност. Нейната степен на корелация с тумор некрозис анализа на Carswell in vivo не е известна, но тъй като се използват специфично миши туморни клетки, вероятно корелацията е голяма. Белтъкът, наречен лимфотоксин в ЕРО публикация №0100641 /supra/, също показва активност в този анализ. Анализът е подобен на описания в патент на САЩ 4,457,916, при който се използват L-M клетки и оцветяване с метиленово синьо. Показано е, че L-929 анализа корелира /за TNF, получен от HL-60/ с цитотоксичността на човешката туморна клетъчна линия.

При използвания тук L-929 анализ, L-929 клетки се получават за една нощ като монослой в микротитрационни панички. Пробите за изследване се разреждат двукратно в паничката, облъчват се с УВ-лъчи и се добавят в подготвените клетъчни монослоеве. Културалната среда в кладенчетата се довежда до 1 мкг/мл актиномицин D. Паничките се инкубират 18 часа при 37°С и визуално се преглеждат под микроскоп. Във всяко кладенче се определя и маркира степента на умрелите клетки - 25,50,75 или 100%. Една единица TNF активност се определя като обратно пропорционалната стойност на разреждането, при което 50% от клетките загиват.

Разработена е по-чувствителна версия на този анализ, при която се определя освобождаването на белязани със ^{35}сяра пептиди в предварително белязаните клетки след третиране с тестовата проба и актиномицин D. Тази версия на анализа може да се използва за количествено определяне на активността, т.е. да се определи относителната активност на материала, транслиращ се в овоцитите. Накратко, активнорастящи L-929 клетки се бележат с ^{35}сяра метионин/200 микрокюри/мл/ за 3 ч в свободна от метионин среда, съдържаща 2% диализиран телешки фетален серум. След това клетките се промиват и се разливат на панички с 96 кладенчета, инкубират се за една нощ и след това се третират с двукратно разредени тестови проби и 1 мкг/мл актиномицин D. След това културите се инкубират за 18 ч при 37°С. От всяко кладенче се вземат по 100 мсл от суспенатантата и се прехвърлят на друга 96-кладенчова паничка, утаяват се с киселина / TCA/ и се концентрират върху стъклени филтри. След това филтрите се промиват с 95% етанол, изсушават се и се преброяват. NP_{40} детергентен контрол е включен във всеки анализ, за да се измери максималната освободена радиоактивност от клетките. Процентът освободена ^{35}сяра се изчислява от съотношението на разликите при броене на третираните клетки и нетретираните контроли, разделено на разликата между NP_{40} третираните клетки и нетретираните контроли, което се пресмята по равенството

$$\% \text{ освободена } ^{35}\text{сяра} = \frac{\text{проба - клетъчна контрола}}{NP_{40} \text{ - клетъчна контрола}} \times 100$$

По високата TNF активност повишава стойностите на това съотношение.

Описаният анализ е модифициран, за да се използва при човешки туморни клетъчни линии. Единиците се определят и % освобождаване се изчислява по същия начин, както и за описаните по-горе L-929 клетки.

BAD ORIGINAL

В.5.в In.vivo анализ. Препаратите могат също така да бъдат тестувани за TNF активност, като се използва свойството на това вещество да убива или репресира растежа на тумори и да предпазва от смърт животното с тумори. Balb/c мишки се инжектират подкожно с различни типове туморни клетки, за да се получи локализиран тумор. Туморните клетъчни линии включват MethA миша фибросаркома, получена като клетъчна суспензия от асцитна течност и MCF-7 човешки карцином на гърдата, която се прилага като 1 мм^3 струпване от клетки.

За целите на анализа женски Balb/c мишки /19-22 гр/ се инжектират подкожно с игла №26 или със суспензия, съдържаща $5x10^5$ фибросаркомни клетки в 0,1 мл среда или с MCF-7 струпване/фибросаркомната суспензия е приготвена от 8 дневна асцитна течност чрез преброяване на клетките и разреждане с без серумна среда/. След 9-10 дни, след като туморът нарастне видимо добре изразен, количества от подлежащ на тестуване TNF / около 1 мкг на мишка/ се инжектират интравенозно, като по желание през следващите дни инжектирането с TNF се повтаря. Резултатите се анализират чрез измерване размера /обема/ на тумора и степента на преживяване.

В.6. Получаване на TNF мутеини. Изобретението съдържа и известен брой модификации на мTNF, при които се получава белтък с оптимална активност. Направени са някои специфични промени в първичната аминокиселинна последователност, които водят до подобна или повишена специфична активност при анализа за цитотоксичност, представен по-горе в В.5. Някои делеции сред първите 10 аминокиселини от последователността на mTNF вода до получаването на белтъци със специфична активност - равна или няколко пъти по-висока от тази на "нативния" рекомбинантен белтък. Безцистеиновите мутеини на mTNF също показват TNF активност подобно на N-крайно делетираните форми на тези мутеини.

Получаването на всеки от тези мутеини се извършва чрез подлагане на експресионните вектори, съдържащи кодиращата последователност за TNF, на сайт-специфична мутагенеза с използването на праймери, отговарящи на желаната кодираща последователност. Така се получават модифицирани експресионни вектори с необходимите / подходящите/ промени в кодиращата последователност. Получените модифицирани вектори се трансформират в подходящи гостоприемници, които след това се култивират при условия, подходящи за продуцирането на кодираните мутеини.

След това тези мутеини се пречистват от бактериалната култура подобно на "нативния" mTNF и е установено, че имат ненамалена или увеличена активност.

В даден случай Δ 4 и Δ 6-10 TNF мутеини са определено по-добри от mTNF по два показателя. Те проявяват по-висока специфична активност и се продуцират като "чисти" продукти. При някои от тези предпочитани мутеини, както е описано по-долу, активността на пречистения белтък при изследването за цитотоксичност е няколко пъти по-висока от тази, показана от TNF. В допълнение, докато пречистеният рекомбинантен mTNF представлява цяла гама от белтъци с явни модификации на страничната верига, което се вижда чрез изоелектрично фокусиране, където тези мутеини дават единични ивици при подобен анализ.

С. Стандартни методи. Повечето от методите, използвани за трансформиране на клетки, конструиране на вектори, получаване на иРНК, получаване на сДНК банки и др. подобни се използват много и повечето от изследователите са запознати със стандартните източници, описващи специфичните условия и методи. Въпреки това за по-голямо удобство следващите параграфи могат да служат като ръководство.

С.1. Гостоприемници и контролни последователности. Прокариотите често са представени от различни щамове на E.coli, но други микробиални щамове също могат да бъдат използвани като бацили, например Bacillus subtilis, различни видове Pseudomonas с или други бактериални щамове. В такива прокариотни системи се използват плазидни вектори, съдържащи начало на репликация и контролни последователности, производни на видове, които са съвместими с използвания гостоприемник. Например E.coli най-често се трансформира с вектори, производни на pBR322 - плазмид, изолиран от E.coli, щам от Boliar, et al./9/. pBR322 съдържа гени,

BAD ORIGINAL

определящи резистентност спрямо ампицилин и тетрациклин, и осигурява допълнителни маркери, които могат да бъдат запазени или разрушени при конструирането на желания вектор. Най-общо използваните прокариотни контролни последователности, включващи промотори за инициация на транскрипцията, по желание с оператор, заедно с последователности за свързване на рибозомите, включват също така често използваните промотори като беталактамазата /пеницилаз-на/ а и лактозната /lac/ промоторна система /10/ и трипотофановата (trp) промоторна система /11/, както и P_L промотора от фага ламбда и последователността за свързване на рибозомите на N-гена /12/, който се използва като портативна контролна област /касета/, както е представено в заявка рег. №578,133, подадена на 8.02.1984 г., и заявена от същия заявите. По принцип, всякаква промоторна система, съвместима с прокариоти, може да се използва.

Освен бактерии, като гостопиемници могат да се използват и еукариотни микроби, като н-р дрожди. Най-често се използват лабораторни щамове на Saccharomyus cerevisiae - хлебните дрожди, въпреки че редица други щамове са на разположение. Освен векторите, използващи 2-микронното начало на репликация /13/, са известни и други плазмидни вектори, подходящи за експресия при дрожди /14,15 и 16/. Контролните последователности на векторите при дрожди включват промотори за синтеза на гликолитични ензими /17,18/. Други известни промотори включват промотора за 3-фосфоглицерат киназата /19/ и тези за други гликолитични ензими като глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа, хексокиназа, пируват декарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкозо-6-фосфат изомераза, 3-фосфоглицерат мутаза, пируват киназа, триозофосфат изомераза, фосфоглюкозо изомераза и глюкокиназа. Други промотори, при които съществува предимството, транскрипцията да се контролира от условията на растеж, са промоторни области за алкохол дехидрогеназа 2, изоцитохром С, кисела фосфатаза, разграждащите ензими, свързани с азотния метаболизъм и ензимните, а отговорни за разграждането на малтозата и галактозата. Счита се, че на 3' края на кодиращите последователности са необходими терминаторни последователности. Такива терминатори се откриват в 3' нетранслиращата се област, непосредствено след кодиращите последователности на производните дрождиеви гени. Много от илюстрираните вектори съдържат контролни последователности, получени от плазмида pepo46, съдържащ гена на енолазата /20/, или от LEUZ гена, съдържащ УЕр13 /21/, но всякакъв вектор, съдържащ съвместни с дрожди промотор, начало на репликацията и други контролни последователности, може да бъде използван за целта.

Също така е възможна и експресията на гени, кодиращи полипептиди и в еукариотни клетъчни култури-гостоприемници, получени от многоклетъчни организми /22/. Полезни клетъчни линии гостоприемници представляват VERO, Hela клетки и клетки от яйчник на Китайски хомяк /CHO клетки/. Експресионните вектори за такива клетки обикновено съдържат промотори и контролни последователности, съвместими с клетки от бозайници, като н-р често използваните ранни и късни промотори от Simian вирус 40/SV40 /23/ или други вирусни промотори, като тези, получени от полиома, Аденовирус 2, телешки папилома вирус или птичи саркома вируси. Общите аспекти на клетъчните системи гостоприемници при бозайници са описани от Аксел, патент на САЩ № 4,399,216 от 16.08.1983 г. Оказва се, че енхансерните области са от голямо значение за оптимизиране на експресията; това са най-общо последователности, разположени преди или след промоторната област в некодиращите ДНК области. При необходимост източниците на репликация могат да бъдат получени от вирусни източници, но интегрирането в хромозомата е рутинен механизъм за ДНК репликацията при еукариоти. Растителните клетки също са достъпни като гостоприемници сега, както и контролни последователности, съвместими с растителните клетки като промотора на нопалин синтетазата и сигналните последователности за полиаденилиране /24/.

С.2. Трансформации. В зависимост от използваните клетки гостоприемници, трансформацията се извършва чрез стандартни методи, подходящи за съответните клетки. Калциевата обработка чрез калциев хлорид /25/ или чрез метода с използване на рубидиев хлорид ($RbCl_2$) /26/, се използват

BAD ORIGINAL

при прокариоти или други клетки, притежаващи съществени бариерни клетъчни стени. Инфектиране с Agrobacterium tumefaciens /27/ се използва при някои растителни клетки. За клетки на бозайници, несъдържащи клетъчни стени, най-често се използва калциево-фосфатният метод на преципитация на Grahan and van der Eb /28/. Трансформации в дрожди се извършват по методите на Van Solingen et al /29/ и Hsiao et al /30/.

С.3. Скриниране на сДНК или геномни банки. Скринират се сДНК или геномни банки чрез метода на колонийна хибридизация. Всяка микротитърна паничка се реплицира върху два нитроцелулозни филтъра /Шлайхер и Шул (S & S) BA-85/ и колониите се оставят да растат на 37°C за 14-16 часа върху агар, съдържащ 50 мкг/мл ампицилин /Amp/. Колониите се лизират и ДНК се фиксира към филтъра след последователно третиране за 5 мин с 500 мМ натриева основа, 1,5 М натриев хлорид и се промиват двукратно за по 5 мин с 5 х стандартен солев цитрат /SSC/. Филтрите се изсушават на въздух и се пекат за 2 часа на 80°C. Филтрите дубликати се прехибридизират на 42°C за 6-8 часа, като на филтър се прибавят 10 мл ДНК хибридизационен буфер /5xSSC pH 7,0, 5xP-p на Денхард /поливинил-пиролидин, Фикол и говежди серумен албумин: 1x=0,02% от всеки/, 50 мМ натриев фосфатен буфер pH 7,0 0,2% SDS, 20 мкг/мл Poly Y и 50 мкг/мл денатурирана ДНК от сперма на пъстърва.

Пробите се хибридизират с киназираната проба при условия, зависещи от строгостта на критерия. Типични средно строги условия представляват температура от 42°C за 24-36 ч с 1-5 мл на филтър с ДНК хибридизационен буфер, съдържащ пробата. За по-строги критерии на хибридизация се използват по-високи температури и по-къси времена на инкубация. Филтрите се измиват 4 пъти по 30 мин всеки, при 37°C с 2xSSC, 0,2% SDS и 50 мМ натриев фосфатен буфер pH 7,0, след което се измиват двукратно с 2x SSC, 0,2% SDS, изсушават се и се авторадиографират при -70°C за 2-3 дни.

С.4. Конструиране на вектори. За конструирането на подходящи вектори, съдържащи желаните кодиращи и контролни последователности, се използват добре познати стандартни методи на лигиране и рестрикция. Изолирани плазмиди, ДНК последователности или синтезирани олигонуклеотиди се разцепват, добавят им се опашки и се лигират отново до получаване на желаната конструкция.

Сайт-специфично ДНК разграждане се осъществява чрез обработка с подходяща рестриктаза /или рестриктази/ при добре известни условия, особеностите на които са посочени от посочени от производителя на тези рестриктази, достъпни на пазара. За пример виж каталога на New Englang Biflabs. Най общо, около 1 мкг от плазмида или ДНК последователност се разцепва от 1 единица от ензима в около 20 мкл буфер. В приведените в описанието примери често се използват рестриктазите в излишък, за да се осигури пълното смилане на ДНК субстрата. Най-често се използват инкубационни времена от 1-2 часа при 37°C, въпреки че тук са възможни вариации. След всяка инкубация белтъкът се премахва чрез екстракция с фенол/хлороформ и може да бъде последвана от екстракция с естер, а нуклеиновите киселини се извличат от течните фракции след етанолна преципитация, след което се пропуска през Sephadex G-50 въртяща се колона. При нужда накъсаните фрагменти могат да бъдат разделени по размери на полиакриламидна или агарозна гел-електрофореза, по стандартните методи. Подобно разделяне подробно е описано в лит. източник /31/.

Рестриктазните фрагменти могат да се направят с тъпи краища след третиране с големия фрагмент /Кленов фрагмент/ на ДНК полимераза I от E.coli при наличие на четирите дезоксинуклеотид трифосфати dNTP при инкубационно време 15-25 мин при 20-25°C в 50 мМ Трис pH 7,6, 50 мМ натриев хлорид, 6 мМ магнезиев хлорид, 6 мМ DTT и 5-10 мкМ dNTP. Кленовият фрагмент запълва 5' лепливите краища, но смачква 3' стърчащи краища на единичните вериги дори и при наличието на четирите dNTP. В даден случай е възможно да бъде извършено селективно поправяне при наличие на един или някои от dNTF според диктуваните от вида на лепливите краища ограничения. След обработка с Кленовия фрагмент сместа се екстрахира с фенол/хлороформ, утаява се с етанол и се прекарва през въртяща се колона със Sephadex G-50. Обработката с S1 нуклеаза при

BAD ORIGINAL

подходящи условия довежда до хидролизата на всеки едноверижен участък.

Синтетични олигонуклеотиди могат да се приготвят по триестерния метод на Matteucci / 32/ или чрез използването на търговски автоматични синтезатори на олигонуклеотиди. Киназиране на единични вериги преди неутрализиране или и бележене се извършва чрез използването на излишък, т.е. около 10 единици от полинуклеотид киназа за 0,1 наномола субстрат при наличието на 50 мМ Трис pH 7,6, 10 мМ магнезиев хлорид, 5мМ дитиотрейтол 1-2 мМ АТФ, 1,7 пикомола ^{32}p-АТФ /2,9 миликюри/милимола/, 0,1 мМ спермидин, 0,1 мМ ЕДТА.

Лигазните реакции се извършват в 15-30 мкл обеми при следните стандартни условия и температура: 20 мМ Трис-солна киселина pH 7,5, 10 мМ магнезиев хлорид, 10 мМ DTT, 33 мкг/мл говежди серумен албумин /ГСА/, 10-50 мМ натриев хлорид също 40 мкМ АТФ, 0,01-0,02 Weiss единици Т4 ДНК лигаза пир 0°С / за лигиране на "лепливи" краища/, или 1 мМ АТФ, 0,3-0,6 /Weiss/ единици Т4 ДНК лигаза при 14°С /за лигиране на "тъпи" краища/. Междумолекулни лигирания на "лепливи" краища обикновено се извършват при 33-100 мкг/мл обща концентрация на ДНК /общо 5-100 нМ концентрация на краища/. Междумолекулни лигирания на тъпи краища се извършват при концентрация на краища =1мкМ обикновено чрез използването на 10-30 пъти моларен излишък на линкери.

При конструирането на вектори чрез използването на "векторни фрагменти" съответният векторен фрагмент обикновено се обработва с бактериална алкална фосфатаза / ВАР/ за премахване на 5' фофата и предпазване от религирането на вектора. Смилането с ВАР се извършва при pH 8 в 150 мМ Трис и при наличието на натриеви и магнезиеви йони, като се използва около 1 единица от ВАР за 1 мкг вектор при 60°С за около 1 час. За получаването на ДНК фрагментите сместа се екстрахира с фенол/хлороформ и се утаява с етанол, след което се обезсолява чрез пропускане през въртяща се колона със Sephacex G-50. По друг начин религирането може да се избегне при вектори, които са били подложени на двойно смилане от две рестриктази, чрез допълнително рестриктазно разграждане на ненужните фрагменти.

За части от вектори, извлечени от сДНК или геномна ДНК, които изискват модификации на секвенциите се използва сайт-специфична праймер D насочена мутагенеза. Извличането се постига чрез използването на праймер праймер синтетичен олигонуклеотид, който е комплементарен към участък от едноверижна фагова ДНК с изключение на малки разлики от няколко нуклеотида, представляващи желаната мутация. Накратко, синтетичният олигунуклеотид се използва като праймер за насочената синтезата на верига, комплементарна на фаговата, и получената двойноверижна ДНК се трансформира в подходящ бактериален гостоприемник, поддържащ фаги. Култури от трансформираната бактерия се посяват върху агар, при което се образуват плаки от единични клетки, съдържащи фага.

Теоретично 50% от новите плаки би трябвало да съдържат фаг с мутиралата едноверижна форма, а 50% да съдържат изходната форма. Получените плаки се хибридизират с киназирания синтетичен праймер при температура, позволяваща хибридизацията само на напълно комплементарни вериги, при което наличието на една или няколко нуклеотидни разлики предпазва от хибридизация. Плаките, хибридизиращи с пробата, се отделят, култивират и от тях се получава ДНК. Подробности по сайтспецифичната мутагенеза са описани по нататък в специфичните примери.

С.5. Проверка на конструкцията. При описаните по-нататък конструкции правилното лигиране при образуването на плазмидите се потвърждава отначало при трансформирането на E.coli от щам ММ294, получен от E.coli (Genetic Stock Center,CGSC № 6135, или други подходящи гостоприемници с лигазната смес. Сполучливите трансформанти се селекционират по наличието на ампицилинова, тетрациклинова или друга резистентност спрямо антибиотици, или чрез използването на други маркери, в зависимост от начина на конструиране на плазмида. Плазмиди от трансформантите се изолират по метода на Clewell и сътр., в лит. източник /32/, обикновено след амплифицирането им с хлорамфеникол, лит. източник /33/. Изолираната ДНК се анализира чрез рестриктази и/или се секвенира по дидезокси

BAD ORIGINAL

метода на Sanger /34/, описан по-късно от Messing и сътр. в лит. източник /35/, или по метода на Maxam, лит. източник /36/.

С.6. Примерни гостоприемници. За клониране и експресия се използват следните щамове гостоприемници. За клониране и секвениране и за експресия на конструкции под контрол на повечето бактериални промотори като гостоприемник се използва щамът на E.coli MM 294 /лит. източник /37, 38/. За експресията под контрола на P_LN_{RBS} промотора се използва щамът на E.coli K12 MC1000 ламбда лизоген, N_7N_{53} cI857 SusP80, ATCC 39531 /по-късно известен като MC1000-39531/.

За M13 фаговете рекомбинанти се използват щамове на E.coli, чувствителни на фагова инфекция, като E.coli K12 щам DG98. DG98 е депозиран в ATCC на 13.07.1984 г. и има кат. № 1965.

Д. Клониране и експресия на човешки TNF. По-нататък са представени методите, използвани за получаването на кодиращата последователност на човешки TNF-1, за прехвърлянето на тази последователност в експресионни вектори и за получаване на експресия на желания белтък.

Д.1. Получаване и пречистване на човешки TNF.

Д.1.а. Индукция на TNF. HL-60 клетки с висока плътност/около $2x10^6$ кл./мл/ се центрофугират, промиват с RpMI 1640 среда без серум и след това се ресуспендират до плътност $1x10^7$ кл./мл. Клетките се третират с 100 нг/мл форболов естер, 12-0-тетрадеканорилфорбол-13-ацетат/TPA/ за 30 мин при 37°C в суспензия при непрекъснато разбъркване. Културите се центрофугират, суспенатантата се декантира, клетките се ресуспендират до $1x10^7$ кл./мл в RPMI, съдържаща 10 мкг/мл бактериален липополизахарид /LPS/ и 10 мкМ калциев йонофор /A23817/, за 4 часа при 37°C и при непрекъснато разбъркване. Клетките се центрофугират при 1200 об./мин за 10 мин, а супернатантите се рецентрофугират при 8000 об./мин за 20 мин. Получената супернатанта се използва в схемата за пречистване, представена в Д.1.б. за получаването на натриев TNF.

Д.1.б. Пречистване на TNF. Около 4-8 л супернатанта, приготвена от индуцирани HL-60 клетки, както е описано в Д.1.а., се концентрират до около 300 мл чрез Amicon филтър с кухи влакна, пропускащ молекули с м.т. под 10000. Концентрираната културална течност се центрофугира, за да се премахнат клетъчните остатъци, а супернатантата се коригира с 30 мМ амониево бикарбонатен буфер с pH 8,2 до проводимост 6,2 м Син. По-нататък разтворът се концентрира чрез ултрафилтрация при използването на PM10 / Amicon/ мембрана и концентрираната течност се центрофугира /20000 x g за 10 мин./

Супернатантата се пропуска през ДЕАЕ йоннообменна колона, уравновесена с 30 мМ амониев бикарбонат /1 мМ натриев хлорид pH 8,2. Колоната се промива със същия буфер. Събират се фракциите, а белтъчното съдържание се определя на 280 нм. Тези несвързани фракции се изследват чрез L-929 анализа за цитотоксичност и фракциите, показващи TNF активност, се обединяват и концентрират чрез ултрафилтрация.

Концентрираният разтвор се пропуска през Sephadex G75 Superfine Pharmacia колона, уравновесена с 30 мМ амониево-бикарбонатен буфер /pH 7.4/. Несвързаните фракции, получени чрез промиване със същия буфер, се измерват с 280 нм и се изследват за TNF. Фракциите с най-висока TNF активност се лиофилизират.

Лиофилизираният белтък се ресуспендира в буфер за нанасяне на проби по Лемли (Lalmmli) и се разделя чрез електрофореза в SDS полиакриламиден гел. Гелът се нарязва на 2 мм ивици и белтъкът от всяка ивица се елюира чрез потапяне на парченцето гел в 1 мл 30 мМ амониев бикарбонат pH 7,4 и клатене за една нощ на стайна температура.

Пробите, съдържащи TNF биоактивност, се натоварват на Vydac C-4 обратнофазова високоефективна течна хроматография (HPLC) колонка, уравновесена с 0,1% трифлуороцетна киселина /TFA/ и активните проби се елюират чрез линеен градиент 0-60% на ацетонитрил в 0,1% TFA. Белтъчното съдържание се определя на 280 нм и 214 нм, а фракциите се изследват за биологична активност след лиофилизиране в 30 мМ амониево-бикарбонатен буфер на pH 7,4. Фракциите, съдържащи TNF активност се лиофилизират отново.

BAD ORIGINAL

Полученият белтък е достатъчно чист за анализ на неговата последователност. Последователността се определя чрез газово-фазов секвенатор /Appliec biosystems Inc/. По-долу е представена получената последователност за първите 22 аминокиселини.

1	2	3	4	5	6	7	8
-Val	-Arg	-Ser	-Arg	-The	-Pro	-Ser	-Asp
9	10	11	12	13	14	15	16
-Lys	-Pro	-Val	-Ala	-Val	-Ser	-Val	-Ala
17	18	19		10	21	22	
-Asn	-Pro	-/Gln/		-/Ala/	-Glu	-Gly	

Пречистеният /от G-75 гела/ белтък се тестува допълнително чрез модификация на L-929 анализа за цитотоксичност чрез алтернативното използване на човешки туморни и нормални клетъчни линии, като субстрат. G-75 фракциите, показващи цитотоксичност при този анализ срещу L-929 клетки, са цитотоксични и срещу Hs939T / меланомна линия/ BT-20 /гръдна карцинома/ , A427 /карцинома на белия дроб/, HT-1080 / карцинома на дебелото черво/ и HT-29 / карцинома на дебелото черво/. Тези фракции не са цитотоксични срещу Hs939 sk /кожни фибробласти/, HaLa клетки /цервикална карцинома/, Hs27F/фибробласти на препуциума/ или COS7 /SV 40-трансформирани маймунски клетки/.

Д.2. Приготвяне на кодиращата последователност. По-нататък е описана процедурата за приготвяне на безинтронна ДНК последователност, която е кодираща за човешки TNF. Човешката промиелоцитна левкемична клетъчна линия, продуцираща големи количества от TNF при индукция, HL-60 линията, получена от ATCC, кат. № CCL 240, се използва като източник на иРНК за формиране на сДНК банка. Чрез използването на олигомерни проби, конструирани на базата на определената белтъчна последователност на TNF, пречистен от тези клетки, се тестува сДНК банката, за да се получи пълната кодираща последователност на този белтък.

Д.2.а. Получаване на обогатена иРНК. Тотална иРНК се екстрахира и пречиства от HL-60 клетки по следния начин, HL-60 клетки се индуцират за TNF продукция, както е описано в Д.1.а, и 4-часовата клетъчна суспензия се утаява чрез центрофугиране. Тотална цитоплазмена рибонуклеинова киселина /РНК/ се изолира по следващия начин. Всички процедури се извършват на 4°С. Клетките се измиват двукратно в ФСБ / фосфатно-солеви буфер/ и ресуспендират в ІНВ /140 мМ натриев хлорид, 10 мМ Трис, 1,5 мМ магнезиев хлорид, pH 8/, съдържащ 10 мМ ванадил аденозинов комплекс лит. източник /39/.

Нейонен детергент от типа на полимер на етиленовия окис /NP40/ се добавя до концентрация 0,3% за лизиране на клетъчните, но не и ядрените мембрани. Ядрата се изолират чрез центрофугиране при 1000xg за 10 мин. Следядрената супернатанта се добавя към равен обем от ТЕ /10 мМ Трис, 1 мМ EDTA, pH 7,5 /наситен фенол/ хлороформ /1:1/, съдържащ 0,5% натриев додецил сулфат /SDS/ и 10 мМ EDTA. Супернатантата се реекстрахира 4 пъти и фазите се развалят чрез центрофугиране при 2000 x g за 10 мин. РНК се утаява чрез коригиране на пробите до 0,25 М натриев хлорид, добавяне на 2 обема 100% етанол и съхранение на -20°С. РНК се утаява чрез центрофугиране на 5000 x g за 30 мин, промита с 70% и 100% етанол и се изсушава. Полиаденилирана /Поли А+/ информационна РНК /иРНК/ се получава от тоталната цитоплазмена РНК чрез хроматография на олиго-dT целулоза лит.източник /40/. РНК се разтваря в ETS /10 мМ трис, 1 мМ EDTA, 0,5% SDS, pH 7,5/ до концентрация 2 мг/мл. Този разтвор се нагрява на 65°С за 5 мин. и след това бързо се охлажда до 4°С. След темперииране на разтвора на РНК до стайна температура, той се коригира с 0,4 М натриев хлорид и бавно се прекарва през олиго-dT целулозна колонка, уравновесена със свързващ буфер /500 мМ натриев хлорид, 10 мМ Трис, 1 мМ EDTA, pH 7,5 /. Преминалият разтвор се прекарва двукратно отново през колонката, след което тя се промива с 10 обема от свързващия буфер. Поли А+ иРНК се елюира чрез аликвоти от ETS, след което се екстрахира еднократно с наситен с ТЕ фенол/хлороформ и се утаява чрез добавяне на натриев хлорид до 0,2 М и 2 обема от 100% етанол. РНК се преутаява двукратно и се промива с 70% и 100% етанол преди изсушаването.

Поли А+ иРНК се фракционира на захарозен градиент в 10 мМ Трис-солна киселина, pH 7,4, 1 мМ EDTA, 10 мМ натриев

BAD ORIGINAL

хлорид и 0,1% SDS. След центрофугиране в Beckman SW40 ротор при 38000 об/мин за 17 часа иРНК фракциите се получават от градиента чрез утаяване с етанол. Фракциите, съдържащи TNF иРНК, се идентифицират чрез инжектиране на иРНК в овоцити и анализ на овоцитните екстракти за цитотоксична активност. Фракциите, съдържащи най-висока активност, се обединява и използва за конструирането на сДНК банка.

Д.2.б. Конструиране на сДНК банки. сДНК се изготвя от обогатената на 16С иРНК фракция чрез използването на олиго-dT праймери, комплементарни на поли А опашките и AMB обратна транскриптаза по метода на Окаяма и сътр. лит. източник /41/ . Чрез този метод се получават значително количество клонове с пълна дължина и при него ефективно се използват като вектори гостоприемници части от два вектора, описани съгласно изобретението - pcDB1 и pLI, които могат да се получат от техните автори. Получените вектори съдържат инсерта, разположен между векторни фрагменти, съдържащи проксимални BamHI и XhoI рестриктазни места; векторът съдържа началото на репликация на pBR322 и генът, определящ Amp резистентност.

Известни са разбира се и други методи за приготвяне на сДНК библиотеки. Един от тях, станал вече класически, използва олиго-dT праймер, обратна транскриптаза, която прикачва към краищата на двуверижната ДНК на поли-dG и ги свързва към подходящ вектор, като pBR322 и неговите производни, който е отворен в желаното рестриктазно място и са му прикачени поли dC опашки. Подробно описание на този алтернативен метод е направено в патента на САЩ № 564,224. от 20.12.1983 г.

При използвания съгласно изобретението метод обогатената иРНК /5 мкг/ се денатурира чрез 10 мМ метил живак при 22°С за 5 мин и детоксикира чрез добавяне на 100 мМ 2-меркаптоетанол /42/. Плазмидът pcDVI се обработва с KpnI, добавят се опашки към краищата му с dTTP и се хибридизира към денатурираната РНК. Тази иРНК, съдържаща олиго-dT праймери, се обработва с обратна транскриптаза и новосинтезираната ДНК се обработва за прикачване на олиго dC опашки с dCTP. След това нежеланата част от pcDV1 вектора се премахва чрез обработка с HindII. Отделно pLI се обработва с PstI, добавят му се опашки с dGTP, обработва се след това с HindIII и се прибавя към поли Т иРНК/сДНК комплекса, съдържащ pcDV1 векторния фрагмент. Добавя се E.coli лигаза и сместа се обработва сДНК полимераза I /Klinan, E.coli лигаза и РНК-аза Н. Получените вектори се трансформират в E/coli K12 MM294, при което клетките стават AmpR.

Д.2.в. Селекция на пробата. Прибавят се олигомери, комплементарни на кодиращата последователност на аминокиселини 8-12 на пречистения TNF белтък. Поради изродеността на кода се приготвят общо 64 14-метра, като възможни варианти за комплементация с тази област на иРНК. 64-те 14-мера се разделят на 4 смеси по шестнадесет. Всяка от тях поотделно се смесва с фракционираната на захарозен градиент и обогатена иРНК, получена, както е описано по-горе, и получената смес се инжектира в овоцитната система за транслация. Използват се контроли чрез необработвана иРНК. Продуцираните в овоцитната система белтъци се подлагат на L-929 анализ за цитотоксичност /^{35}сяра освобождаване/, като белтъците, извлечени от овоцити, инжектирани с контролната иРНК и с три от смесите на иРНК с олигомери, показват активност. При този анализ на "хибриден арест" само овоцитите, инжектирани с иРНК, третирана със олигонуклеотидната смес, съдържаща последователността

A T
GC(G)AC(C)GGCTTGTC
T A
C C

е неактивна. Специфичността на тази олигомерна смес по-нататък се определя чрез dot blot хибридизация с обогатена иРНК, получена, както е описано по-горе, от индуцирани и неиндуцирани HL-60 клетки, както и със съответната фракция иРНК, получена от клетки продуценти на лимфотоксин. Тази смес се хибридизира добре с индуцираната иРНК, но не се хибридизира със съответните иРНК фракции от неиндуцираните и от лимфотоксинпродуциращите клетки. При това Нодърн блотове с използването на киназираната смес като проба показват, че тя съдържа последователности, които кросхибридизират с 18С /рибозомната/

BAD ORIGINAL

РНК фракция и сДНК на pBR322.

Тази олигомерна смес по-нататък се фракционира, като нейните членове се синтезират като 8 двойки от 14-мери, всяка от които се използва за анализ на "хибриден арест" по описания по-горе начин. Само двойката, притежаваща последователността

е способна да инхибира синтеза на TNF в овоцитите. Дот блот експерименти с използването на фракционирана иРНК фракция от индуцирани HL-60 клетки, индуцирана тотална поли A+ РНК от HL-60 клетки, неиндуцирана HL-960 поли A+ РНК и ДНК на pBR322, потвърждават специфичността на посочената по-горе 14-мерна двойка и неспособността на останалите двойки да хибридизират към желаната иРНК.

Д.2.г. Получаване на кодиращата последователност. сДНК библиотеката, получена, както е описано по-горе, се тестува с 14-мерната двойка, идентифицирана в Д.2.в. 28 колонии, които се хиблидизират със сонда, се отделят, култивират се и от тях се изолира плазмидна ДНК. Селекционират се плазмиди, съдържащи инсерти с дължина, достатъчна за кодирането на цялата последователност, и някои от тях се тестуват за наличие на правилната последователност чрез хибридна транслация в комбинация с анализа за цитотоксичност на базата на освобождаването на ^{35}сяра, както е описано по-горе в В.5. Хибридно-транслационните анализи използват тестуваната последователност за извличане на нужната иРНК от нефракционирани препарати и това се доказва чрез анализ на белтъка, получен в овоцитната система за транслация, инжектирана със съответния изолиран иРНК препарат.

Тестуваната плазидна сДНК се свързва към филтри и филтрите се третират с поли A+ РНК, изолирана от индуцирани HL-60 клетки. След това хибридите се елюират от филтрите и се инжектират в овоцитната система за транслация. От овоцитите се екстрахира белтък, който се тестува чрез ^{35}S версията на L-929 цитотоксичната проба. Резултатите за някои хибридизиращи клонове, означени като E2-E4, E6 и E8 са показани в следващата таблица

Проба	Освобождаване на ^{35}сяра, в %
E1	7
E2	23
E3	32
E4	33
E6	26
E8	11
pBR322	9
A+	34
B+	24

/A+ и B+ са контроли, съдържащи обогатена иРНК, получена от захарозен градиент; E1 и pBR322 представляват отрицателни контроли./

Рестриктазен анализ и частично секвениране на инсертите показват, че два плазмида pE4 и pB11 вероятно съдържат пълната TNF кодираща последователност. Резултатите от този анализ за pE4 са показани на фиг.2.

Съгласува се pE4 и се определя правилната четяща рамка за THF чрез нанасяне на аминокиселинната последователност на трите възможни четящи рамки върху определената чрез N-терминално секвениране на TNF N-терминална област на нативния зрял TNF от фиг. 1. Аминокиселините на зрелия белтък са номерирани като валинът е под №1. Както е отбелязано по-горе, хомологията не е пълна. Въпреки това, високото ниво на хомология показа, че е избрана правилната сДНК. Направена е и проверка на експериментално определените рестриктазни места от фиг. 2. HindIII мястото, разположено по-горе от 3' PstI мястото на 1,1 PstI фрагмента, е същевременно по-надолу разположено от стопкодона, което позволява изолирането на кодиращата последователност като HindIII фрагмент след модифициране на участъка, разположен преди него по начин, описан по-нататък.

Д.3. Характеристика на човешкия TNF на базата на неговата ДНК последователност. Както се вижда от сДНК последователността от фигура 1, зрелият TNF белтък съдържа 157 аминокиселинни остатъци и е с молекулно тегло около 17354 без гликозилиране. Отделно водещата /лидерна/ последователност съдържа около 76 аминокиселини, започваща с първия наличен Met старт кодон. Има два цистеинови остатъка в позиции 69 и 101, поради което се предполага, че активната структура съдържа дисулфиден мост.

BAD ORIGINAL

Д.4. Подготовка на експресионни вектори.

Д.4.а. Модифициране на N-терминалните кодони.

За по-ефикасната експресия на зрелия белтък е удобно да се въведе ATG старт кодона непосредствено преди GTC последователността, кодираща N-крайния валин на зрелия белтък, означен с № 1 във фиг. 1, както и да се осигури HindIII място, непосредствено преди ATG кодона за по-лесното лигиране в подходящи експресионни вектори. Това се извършва чрез сайтнасочена мутагенеза, както е описано в С.4.

По-подробно ДНК фрагментът, съдържащ участъка преди кодиращата последователност, се изрязва от pE4 чрез смилане с PstI, изолира се чрез агарозна гел електрофореза и електроелюция и се лигира в PstI мястото на бактериофаг M13 мп18.

Лигираният фаг се трансдуцира в замразени клетки на E.coli K12 щам DG98 / ATCC № 39768/, които се култивират чрез посяването им на среда, съдържаща $5x10^{-4}$M изопропил тиогалактозид /PTG/, получен от Сигма Хим. /Св.Луис, МО/ и 40 мкг/мл X-гал. Алфа некомплементиращи бели плаки се отделят и прехвърлят на прясна среда. Скринират се миникултури за съдържание на рекомбинантна едноверижна фагова ДНК, съдържаща инсерти с очакваната /1,1 кб/ дължина. Структурата на желания рекомбинантен фаг, означен като клон 4.1 се потвърждава чрез рестриктазен анализ.

Използва се химично синтезиран и пречистен 33-мерен олигодез оксирибонуклеотид, съдържащ последователността 5' - GAAGATGATCTGACCATAAGCTTTGCCTGGGCC-3', за въвеждане на HindIII рестриктазно място преди ATG кодона на инициация и GTC кодона на първата аминокиселина /валин/ на зрелия TNF белтък.

10 пикомола от олигонуклеотида се хибридизират с 2,6 мкг ДНК от едноверижния клон 4.1 в смес, съдържаща 100 мМ натриев хлорид, 20 мМ Трис-солна киселина, pH 7,9, 20 мМ магнезиев хлорид и 20 мМ бетамеркаптоетанол, при нагряване на 67°C за 5 мин и 42° за 25 мин. Хибридизационните смеси се охлаждат на лед и се довеждат до краен обем 25 мкл в реакционна смес, съдържаща 0,5 мМ от всеки dNTP, 17мМ Трис-солна киселина pH 7,9,17 мМ магнезиев хлорид, 83 мМ натриев хлорид, 17 мМ бетамеркаптоетанол, и 5 единици от ДНК полимераза I Klenow фрагмент и инкубирани на 37°C за 1 час. Реакциите се спират чрез нагряване до 80° и реакционните смеси се използват за трансформация на компетентни DG98 клетки, които след това се посяват на агарови петрита и инкубират за една нощ за получаването на фагови плаки.

Петрита, съдържащи мутантни плаки на клон 4.1, и петрита, съдържащи немутантни плаки на клон 4.1, се охлаждат на 4°C и фаговите плаки от всяко пети се прехвърлят върху два кръгли нитроцелулозни филтъра чрез поставяне на сух филтър върху петрито с агар за 5 мин - първия филтър и за 15 мин - втория филтър. След това филтрите се поставят върху дебели филтърни хартии, накиснати в 0,2 Н натриева о-ва, 1,5 М натриев хлорид и 0,2% Тритон X-200 за 5 мин и неутрализирани чрез поставянето им върху филтърни хартии, накиснати с 0,5 М Трис-солна киселина pH 7,5 и 1,5 М натриев хлорид за 5 мин. Филтрите по подобен начин се промиват двукратно върху филтри, накиснати в 2 x SSC, след което се изсушават и се изпичат във вакуум сушилня за 2 часа на 80°C. Филтрите-дубликати се прехибридизират на 42°C за 4 часа в 10 мл на филтър от ДНК хибридизационен буфер / 5xSSC, pH 7,0, 4хр-р на Денхардт /поливинилпиролидин, фикол и говежди серумен албумин, 1x=0,2% от всеки/, 0,1% SDS, 50 мМ натриево-фосфатен буфер, pH 7,0 и 1000 мкг/мл денатурирана ДНК от сперма на пъстърва. Приготвят се белязани с ^{32}Ф проби чрез киназиране на праймера с белязан АТФ. Филтрите се хибридизират с по $5x10^6$ имп/мл от белязания с ^{32}Ф праймер в 1-5 мл на филтър от ДНК хибридизационния буфер за 8 часа при 64°C.

Филтрите се промиват еднократно на стайна температура за 10 мин с 0,1 % SDS, 20 мМ натриев фосфат /буфер/ и 6xSSC; веднъж при 37°C да 20 мин в буфер и 2 x SSC; веднъж на 50°C за 20 мин с буфер и 2 x SSC; и накрая при 60°C за 20 мин в буфер и 1 x SSC. След това филтрите се изсушават на въздух и се авторадиографират на -70°C за 4 часа.

Тъй като олигонуклеотидният праймер е така конструиран, че да създаде ново HindIII

BAD ORIGINAL

рестриктазно място в мутантните клонове, изолират се ДНК /репликативна форма -PF/ от известен брой клонове, хибридизирани с праймера и тази НК се смила с HindIII рестриктазно място /M13-AW701/ се отделя и инкулира в култура от DG98 клетки, а след това се изолира едноверижна ДНК от културалната супернатанта и двойноверижна PF ДНК от клетъчната утайка. Правилната последователност се потвърждава от дидеоксисеквенирането.

Правилно синтезираните вериги се изолират и смилат с PstI и HindIII /частично/ или само с HindIII за лигиране в експресионни вектори.

Д.4.б. Конструиране на експресионни вектори. За експресията в прокариоти кодиращата последователност /заедно с няколко 3' нетранслиращи се нуклеотиди/ се изолира от двойноверижен M13-AW701 по два начина.

По първия метод двойноверижната M13-AW701 се смила с PstI и след това частично с HindIII за получаване на HindIII-PstI кодираща последователност. Частично смилане с HindIII се налага поради няколко HindIII места в M13-AW701 и може да бъде извършено чрез използване на една десета от количеството рестриктаза, необходимо за пълното смилане на ДНК. Сместа се инкубира на подходящата за ензима температура и се вземат аликвотни части на 10 мин интервали в продължение на 1 час. Тези аликвотни части се натоварват на гел и получените ДНК фрагменти се анализират. Времето на инкубация, осигуряващо най-висок добив на желания фрагмент, се избира за препаративно смилане с рестриктазата, след което фрагментът се пречиства от гела чрез електроелюция.

PstI/BamHI фрагментът, съдържащ 3' - некодиращата последователност на TNF гена /виж Фиг.2/ се пречиства от pE4 след смилане на ДНК с ензимите PstI и BamHI.

Общо HimdIII/PstI и PstI/BamHI фрагментите образуват кодиращата последователност плюс 600 нд 3'-нетранслиран участък от ДНК. Двата фрагмента се лигират в HindIII/BamHI разграден гостоприемников вектор pTRP3, както следва:

pTR3 /виж по-долу/ съдържа триптофановия промотор и място на свързване на рибозомите при E.coli. pTRP3 се разгражда с HindIII и BamHI и векторният фагмент се пречиства на агарозен гел. След това изолираният фрагмент се лигира с по-горе описаните HindIII/PstI и PstI/BamHI сегменти чрез тройно лигиране и сместа се използва за трансформация на E.coli mM294 до Амп резистентност като така се получава плазмидът pAW701.

По втория метод двойноверижна M13-AW701 ДНК се разгражда с HindIII и фрагментът, съдържащ гена, се изолира чрез агарозен гел. Изолираният фрагмент се лигира с обработен с HindIII и BAF pT33 и се трансформира E.coli MM294 до получаване на pAW702.

pFC54.t /ATCC 39789/, съдържащ P_L промотора и позитивната ретрорегулаторна последователност на бацилус, или pPLOP / виж по-долу/ могат също да бъдат използвани като вектори. Тези вектори се смилат с HindIII и BamHI и големите плазмидни фрагменти, съдържащи контролните последователности, се пречистват на агарозен гел. HindIII/PstI и PstI/BamHI фрагментите на TNF гена, получен както е описано по-горе, се лигират чрез тройно лигиране в HindIII и BamHI местата на тези вектори, при което се получават плазмидите pAB711 и pAB712. Алтернативно пречистеният HindIII фрагмент от pE4 може да се лигира в обработен с HindIII и BAP pFC54.t или pPLOP до получаването на pAW713 или респективно pAU714.

Д.4.в. Експресия на TNF в прокариотни гостопиемници.

pAW701 и pAW702 се трасформират в E.coli MM294 и културите растяха при условия, подтискащи триптофановия /трф/ промотор. Продукцията на TNF се индуцира чрез изчерпване на триптофана. По аналогичен начин се конструира pAW711 и се тнасформира в E.coli MC1000-39531 клетки, които се индуцират през повишаване на температурата. След няколкочасово култивиране при условия на индукция, клетките се озвучават и озвучените препарати се тестуват за наличие на TNF чрез L-929 анализа за цитотоксичност. Получените\резултати са , както следва.

Плазмид	V/ml
701	$1,3 \times 10^4$
702	$1,3 \times 10^4$
711	2×10^5

BAD ORIGINAL

Единиците за TNF активност се определят, както е показано в В.5.

Д.4.г. Експресия на TNF в еукариотни гостоприемници.

Векторът pB11, изолиран от сДНК банката, както е описано в Д.2.г., съдържа SY40 промотора, разположен съседно на TNF кодиращата последователност. Всички от 28-те позитивно хибридизиращи колонии би трябвало да съдържат тези последователности, включително pE4 и pB11, и следователно могат да се експресират в подходящи бозайникови гостоприемници. Поради това pB11 се използва за трансформация на COS-7 клетки на маймунски бъбрек и клетките се култивират при условия, позволяващи индукцията на SY40 промотора. Тъй като pB11 съдържа сигналната последователност, която функционира в клетъчните системи на бозайници, TNF се секретира в средата. TNF се тестува в супернатантата над монослоя от COS-7 клетки чрез измерване на освобождаването на ^{35}сяра от L-929 клетките и резултатите се представят по-нататък.

Плазмид	^{35}S освободена /cpm
B11	22,763
E9 /отрицат.контрола/	2,739
-ДНК	2,565

Д.5. Характеризиране на рекомбинантния TNF.

Д.5.а. Пречистване. Клетките на E/coli DG95 /ламбдализоген, подобен на MC1000-39531/, трансформирани с pAW711, се култивират на 37°C в стандартна хранителна среда до $ОД_{600}$ около 0,5 и след това индуцирани чрез покачване на температурата до 42°C. След 2 часа клетките се озвучават и озвучените клетки се тестуват за TNF активност чрез Л-929 анализа за цитотоксичност /супра/. Озвучената смес след това се натоварва на DEAE сефарозна колона Pharmacia и се промива с буфер /10 мМ Трис, pB 8,2, 1мМ натриев хлорид/. Чрез стъпаловидно елюиране с 0,02 М, 0,04 М, 0,1 М и 0,8 М натриев хлорид се получават фракции, съдържащи TNF активност.

По-голяма част от TNF активност се елюира с 0,04 М натриев хлорид. Тези фракции се концентрират чрез ултрафилтрация и след това се пречистват чрез HPLC с използване на фенил TSK5PW колона /LKP/. TNF белтъкът се задържа на колоната при наличие на 1,8 М амониев сулфат в 0,1 М натриев фосфат pH7,0 и се елюира при около 0,4 М амониев сулфат в процеса на намаляване на концентрацията на амониевия сулфат в колоната до нула. Фракциите, съдържащи TNF, се концентрират чрез ултрафилтрация и се натоварват на GH75 колона /Амикон/ за получаването на чист TNF.

Д.5.б. Разделяне на TNF мутеини.

Изоелектрофокусирането показа, че TNF, получен, както е описано в предходния параграф, се състои от няколко фракции с различни pI стойности, вариращи между 5,8-6,5. Показано е, че всичките основни фракции представляват очакваният зрял TNF, но също така се съдържа и контаминантна мутеинна форма 4TNF. Резултатите от изоелектрофокусиращия гел показват наличието на различни модификации на TNF.

За да се раздели Δ mTNF от 4TNF в препаративни количества, DEAE сефарозната колона, описана в Д.5., се елюира с използването на по-висока степен на фракциониране, при което се получава фракция при 0,03 М натриев хлорид, обогатена на Δ 4TNF преди елюирането на главния пик, съдържащ Δ mTNF.

Обогатената на Δ 4TNF фракция се концентрира и натоварва на фенил TSK-5PW колона за HPLC при условията, описани по-горе. Хроматография под високо налягане HPLC на обогатената фракция води до получаването на пик, съдър-жащ mTNF при около 0,4 М амониев сулфат, както е описано по-горе, и пречистен Δ 4TNF, който се елюира при прилагане на обратен градиент от 0,1 М фосфат pH 7 до дейонизирана вода към колоната. Пиковите фракции Δ 4TNF се концентрират и по-нататък се пречистват на GH75, както е описано по-горе, до получаването на хомогенен Δ 4TNF с pI 5,8, определено от изоелектрофокусиращи гелове.

Тестува се специфичната активност на фракции от Δ 4TNF пиковете, получени при пречистването на GH75, като се определя и тяхната концентрация по поглъщането на 280 нм и се получават следващите резултати.

BAD ORIGINAL

Номер на фракцията	Белтъчна концентрация мг/мл	Биоактивност ед./мл	Специфична активност ед./мг
16	0,043	$4,7x10^6$	$1,1x10^8$
17	0,091	$1,9x10^7$	$2,1x10^8$
18	0,102	$1,4x10^7$	$1,4x10^8$
19	0,063	$7,0x10^6$	$1,1x10^8$
20	0,035	$2,4x10^6$	$6,9x10^7$

Средната специфична активност, която съвпада с пика, както е типично за чист белтък, е 1,3 x 10^8 ед./мг. Тази стойност е около 10 пъти по-висока от получената за мTNF.

Д.5.в. Потвърждаване на мTNF и Δ 4TNF последователността. Аминокиселинният състав на двата вида TNF се сравнява и резултатите са представени по-нататък.

Аминокиселина	Предполагаем /сДНК/	TNF pI 5,8 -6,5 състав	TNF_2 pI 5,8 състав	Разлика TNF_1-TNF_2
Асп	12	12,7	12,4	0,3
Тре	6	6,2	6,1	0,1
Сер	13	12,6	10,9	1,7
Глн	20	20,5	20,2	0,3
Про	10	10,1	10,3	-0,2
Гли	11	11,1	11,1	0,0
Ала	13	13,4	13,1	0,3
Вал	13	10,9	10,2	0,7
Мет	0	0,2	0	0,2
Иле	8	6,5	6,6	-0,1
Лев	17	18,7	18,5	0,2
Тир	7	6,9	7,0	-0,1
Фен	4	4,0	4,0	0,0
Лиз	6	6,1	6,2	-0,1
Хис	3	3,0	3,0	0,0
Арг	9	9,0	8,0	1,0
н	152	151,9	147,4	4,5

И двата белтъка имат състав, подобен много на този, прогнозиран от сДНК последователността; но Δ 4TNF не съдържа 2 серинови, 1 валинов и 1 аргининов остатък. Делетирането на тези остатъци от N-крайната последователност се потвърждава чрез секвениране на Δ 4TNF чрез автоматичен белтъчен секвенатор, който дава следната последователност за първите 10 аминокиселини. Ser-ArgI-Thr-Pro-Sex-Asp-Lys-Pro-Val-Ala.

При сравняване на тази последователност с изведената аминокиселинна последователност от фиг. 1 се вижда, че при този белтък липсват първите 4 аминокрайни остатъка Val-Arg-Ser-Ser, но че и той има N-терминална последователност, съвпадаща в съответните позиции.

Д.6. Получаване на гена за Δ 4TNF и неговата експресия в E.coli. Химично синтезиран, пречистен 35-мерен олигодезоксирибонуклеотид с последователност 5'-CACTCGGGGTTCGAGACATAAGCTTTGCCTGGGCC-3' се използва да бъдат премахнати и следователно делетирани 12-те нуклеотида, кодиращи 4-те N-крайни аминокиселини, разположени след метиониновия иницииращ кодон.

10 пикомола от олигонуклеотида се хибридизират с 2,6 мкг от едноверижната ДНК на клон M13-AW701 в 15 мкл от смес, съдържаща 100 мМ натриев хлорид, 20 мМ Трис-солна киселина pH 7,9, 20 мМ магнезиев хлорид и 20 мМ бетамеркаптоетанол, при нагряване на 67°C за 5 мин и 42°C за 25 мин. Реасоциираните смеси се охлаждат на лед и довеждат по 25 ml краен обем, като реакционната смес съдържа 0,5 мМ от всеки dNTP, 17 мМ Трис-солна киселина pH 7,9,17 мМ магнезиев хлорид, 83 мМ натриев хлорид, 17 мМ бетамеркаптоетанол, 5 единици от ДНК полимераза I Klenov фрагмент, и се инкубира на 37°C за 1 час. Реакциите се спират чрез нагряване на 80°C и реакционните смеси се използват за трансформация на компетентни DG 98 клетки, които след това се посяват на агарови петрита и се инкубират една нощ за получаване на фагови плаки.

Петрита, съдържащ и мутантни клонове M13-AW701, образували плаки, както и 2 петрита, съдържащи немутирали M13-AW701 фагови плаки, се охлаждат на 4°C и фаговите плаки се прехвърлят върху два /за всяко петри/ кръгови нитроцелулозни филтъра чрез полагане на сухия филтър върху агаровото

BAD ORIGINAL

петри за 5 мин - първия филтър и 15 мин - втория филтър. След това филтрите се поставят върху дебели филтърни хартии напоени с 0,2 Н натриева о-ва, 1,5 М натриев хлорид и 0,2% Тритон Н-100 за 5 мин, и се неутрализират чрез поставянето им върху филтърни хартии, напоени с 0,5 М Трис-солна киселина pH 7,5 и 1,5 М натриев хлорид за 5 мин. Филтрите се промиват по подобен начин с 2 х SSC, сушат се и се изпичат във вакуумсушилня на 80°С за 2 часа. Филтрите дубликати се прехибридизират на 42°С за 4 часа с 10 мл на филтър разтвор на ДНК хибридизационен буфер /5xSSC, pH 7,0, 4хр-р на Денхардт / поливинилпиролидин, фикол и говежди серумен албумин, 1х=0,02% от всеки/, 0,1% SDS, 50 мМ натриево-фосфатен буфер, pH 7,0 и 100 мкг/мл денатурирана ДНК от сперма на пъстърва. Приготвят се белязани с ^{32}Ф проби чрез киназиране на праймера с белязан ATF. Филтрите се хибридизират с по $5x10^6$ имп/мин/мл от белязания с ^{32}Ф праймер в 1-5 мл на филтър ДНК хибридизационен буфер на 64°С за 8 часа.

Филтрите се промиват веднъж на стайна температура за 10 мин с 0,1% SDS, 20 мМ натриев фосфат/буфер/ и 6xSSC, веднъж на 37°С за 20 мин в буфер и 2xSSC; веднъж на 50°С за 20 мин в буфер и 2xSSC; и накрая на 60°С за 20 мин в буфер и 1xSSC. Филтрите се изсушават на въздух и се авторадиографират на -70°С за 4 часа.

PF-ДНК от колоните, даващи позитивни сигнали, се разграждат с HindIII и фрагментът, съдържащ мутиралата TNF кодираща последователност, се изолира чрез гел електрофореза. Изолираната последователност се лигира в pAW711, обработен с HindIII и BAP, при което се получава pAW736. Наличието на 12-нуклеотидна делеция се доказва чрез рестриктазен анализ с HindIII и PvuII; pAW736 съдържа 134 нд HindIII/Pvr-II фрагмент в сравнение с 146 нд HindIII/PvuII фрагмента, съдържащ се в pAW711. pAW736 се депозира с ATCC от 10.04.1985 и има каталожен № 53092.

Клетки на E.coli DG95, трансформирани с pAW736, се култивират и индуцират, както е описано по-горе. Клетките се озвучават по показания по-горе начин и отделни проби се анализират чрез 12,5% SDS-PAGE. Δ4TNF белтъкът се пречиства по описания по-горе метод и се показва, че е идентичен с получения преди Δ 4TNF чрез изоелекрофокусиране. Изолираният Δ 4TNF се тестува чрез L-929 анализа за цитотоксичност и се показва, че притежава специфична активност приблизително $2x10^8$ ед./мг.

Д.7. Конструиране и активност на други мутеини на TNF. Д.7.а. Конструиране.

По подобен начин на този, описан в Д.6., се приготвят експресионни вектори за получаване на TNF делеционни мутеини, при които липсват първите 3-11 крайни аминокиселинни остатъци в сравнение с последователността от фиг. 1. На фиг. 3 са представени означенията на получените вектори, както и олигомерите, използвани при сайт специфичната мутагенеза за получаване на съответните делеции. На тази фигура също са представени векторните означения и олигомерите, използвани за конструирането на мутеините Δ 156-, Δ 150-, Δ 140-TNF, както и Des-Ser_3Des-Ser_4 и $Val_{15}ser_{16}$ мутеини.

Ser_{69} или Ser_{101} Мутеини

По подобен начин се използва и олигонуклеотид насочената мутагенеза за получаване на мутантен TNF ген, кодиращ мутеин с TNF активност, при който cis_{69} е заменен с друга аминокиселина или е делетиран и/или $цис_{101}$ остатъкът е заменен или делетиран. Например за превръщането на cis_{69} в ser_{69} най-подходящ е олигонуклеотидният праймер 5'-CATGGGTGCTCGGGCTGCCTT-3'. В този олигонуклеотид има T-A замяна в триплета, комплементарен на кодон 69 на TNF гена. По подобен начин cis_{101} може да бъде превърнат в ser_{101} чрез праймер, съдържащ съответната замяна в триплета, комплементарен на кодон 101.

Клонът 4.1, получен чрез смилане на pE4 с pstI, както е описано в Д.4.а., се подлага на сайт-специфична мутагенеза, както е описано в Д.4.а., но чрез използването на праймера 5'-CATGGGTGCTCGGGCTGCCTT-3', който е комплементарен на последоватлеността, съседно разположена на цистеина в позиция 69, но съдържа нуклеотиди, комплементарни на този кодон, които предизвикват промяната от TGC на AGC. Мутантните плаки се откриват и доказват чрез секвениране, както е описано по-горе. Една плака, съдържаща желаната мутация, MB-AW731, се разгражда с AvaI и PstI и получеият фрагмент се легира в PstI/

BAD ORIGINAL

AvaI смления pAW711. Лигазаната смес се използва за трансформация на E.coli MC1000-39531 до Amp резистентност и получените трансформанти се скринират с праймера за наличие на правилната последователност. Една колония, означена като pAW731, се използва за експресия на модифицираната последователност. pAW731 се депозира с ATCC от 25.01.1985 г. и има каталожен № 53007.

По аналогичен начин се получава pAE741 - експресионен вектор за $сер_{101}$ TNF.

ДНК последователността, кодираща за цистеин-69 и/или $цистеин_{101}$, липсващи TNF мутеини се използва за модификация на N-крайно или C-крайно делетирали мутеини за получаване на съответните "двойни" мутантни форми. Експресионните вектори за тези мутеини се конструират чрез използването на подходящи рестриктази за прехвърлянето на фрагменти от ДНК кодиращите участъци, съдържащи тези модификации във векторите, приготвени както е описано по-горе. Областите, съдържащи Ser_{69}, Ser_{101} и $Ser_{69}Ser_{101}$ TNF форми се получават от плазмиди pAW731, pAW732 или съответно pAW735. По-подробно плазмидът pAW731 е описан в предходния текст; pAW732 и pAW735 кодират Ser101 TNF и Ser69Ser101 TNF и са конструирани по аналогичен начин. Така получените експресионни вектори се трансформират в E.coli и клетките се култивират и индуцират, както вече е опоисано, за да продуцират желаните белтъци. Получените TNF мутеини имат подобна активност, като тази на mTNF.

Д.7.б. Експресия на допълнителни мутеини.

Клетки на E.coli MC1000-39531, съдържащи pAW731, се култивират и индуцират при по-висока температура, както е описано в Д.5.а. Озвучената смес от индуцирани клетки се тестува и е изчислено, че има приблизително същата TNF активност на мл, както тази на pAW711 трансформантите. SDS анализът показа, че количеството на 17 кД TNF белтъка в тези екстракти е около 5 пъти по-малко, което означава, че специфичната активност на Ser_{69} TNF е по-висока от тази на непроменения белтък.

Пречистен /95%/ непроменен белтък се редуцира и алкилира чрез обработка с DTT и йодоацетат по метода, описан по-долу. Докато нетретираният белтък е с активност 2,6 .x10⁴ ед./мл, то редуцираният, или редуцираният и алкилиран белтък има активности 4,4-4,8x10⁴ ед./мл.

Обработка	Активност
Без ДТТ	2,6x10⁴
0,1 мМ ДТТ	3,3x10⁴
1 мМ ДТТ	4,8x10⁴
2 мМ ДТТ	3,9x10⁴
10 мМ ДТТ	1,2x10⁴
20 мМ ДТТ	1,7x10⁴
буфер+2,4 мМ IAA	1,5x10⁴
1 мМ ДТТ+2,4 мМ IAA	4,4x10⁴

По напълно аналогичен начин на този, описан за pAW711, плазмидите от фиг.3, кодиращи за N-крайни делеционни мутеини на TNF, се трансформират в E.coli и трасформираните клетки се култивират и индуцират за получаване на продукция от желания белтък. Така получените рекомбинантни белтъци се пречистват и тестуват подобно на мTNF и Δ 4TNF. При L-929 анализа за цитотоксичност специфичните активности на тези мутеини описват една камбановидна крива с оптимум при Δ 6-8TNF. Установено е, че специфичните активности на тези мутеини са 5-10 пъти по-високи от тази на мTNF. Тези резултати са представени на фигура 4.

На фиг. 5 и 6 е показано, че мутеините се получават в по-хомогенна форма от мTNF при условията на рекомбинантна продукция, респ. пречистени препарати на мTNF и различни мутеини след SDS полиакриламидна гел електрофореза и изоелектрофокусиране. Всяка фигура показва резултатите от експресионните продукти на pAW711 /мTNF/ и pAW736, pAW739, pAW737, pAW740, pAW741 и pAW742, кодиращи за TNF мутеини, при които липсват респ. 4,6,7,8,9 и 10 N-крайни аминокиселини.

На фиг. 5 всички белтъци са хомогенни, което означава, че препаратите са чисти по отношение на размера на изолирания белтък. Резултатите от фиг. 6 показват, че продуктът на pAW711 /мTNF представлява смес от белтъци с различни pI стойности, означаващо наличие на различни модификации на веригата. Продуктът на pAW736 съдържа

BAD ORIGINAL

минорни количества от белтъци с модифицирани странични вериги, докато експресионните продукти на останалите плазиди са хомогенни.

Д.8. Резултати от in vivo анализа.

Рекомбинантният мTNF/pTNF е активен в in vivo анализа, описан в параграф В.5.б. на фигурите 7а и 7б е показан ефектът от инжектирането на 0,5, 1,0 и 2,0 мкг от pTNF върху растежа на миша фибросаркома и преживяемостта на гостоприемника. При тези анализи всяка посочена доза на TNF представлява количеството за единична инжекция.

Инжектирането започва 9 дена след имплантирането на тумора и продължава още 6 дена с по една инжекция на ден. На фигура 7а е показан ефектът на TNF върху туморния растеж започвайки инжектирането с TNF. Стрелките под абцисата показват времето на инжектиране. Тези резултати показват, че дори 6х0,5 мкг от pTNF, инжектирани интравенозно, ограничават всяко значително нарастване в туморния обем в сравнение с контролите. На фигура 7б е показана степента на преживяемост, започвайки от време 0, като последният ден от инжектирането с TNF/т.е. 10-тия ден от фиг. 7а/. Резултатите показват, че процентът на преживяемост рязко нараства и при трите използвани дози на инжектиране.

При мишки, имплантирани с MCF-7 тумори, началото на интравенозните инжекции с TNF е на осмия ден след туморната имплантация. Първата инжекция е токсична / 5 от 10 мишки умират/ и последвалите инжекции, правени по една дневно /общо 5/, съдържат 1 мкг на мишка. Мишките също така се инжектират с естрадиол мускулно в дните 0, 2, 4, 9, и 11. За периода от 14 дни туморният обем на инжектираните с TNF мишки нараства от 30 мм^3 до около 50 мм^3, докато този на контролите - от 30 мм^3 да 130 мм^3.

Д.9. Конструиране на pPLOP. pPLOP е депозиран в ATCC на 18.12.1984 с каталожен № 39947. Неговото конструиране е описано по-нататък.

Д.9.а. Начало на репликацията. pCS3 има начало на репликация, което осигурява висок брой на копията на вектора гостоприемник pPLOP при високи температури. Неговото конструиране е описано подробно в патент на US № 541,948 от 14.10.1983 г. pCS3 е депозиран на 3.07.1982 г. и означен с ATCC № 39142.

pCS3 е получен от pEW27 и p0P9. pEW27 е описан от Вонг лит. източник /43/. Той съдържа мутации около неговото начало на репликация, водещи до температурно регулиране на броя на неговите копия. В резултат на тези мутации репликация, водеща до голям брой копия, протича при високи температури, а при по-ниски температури броят на копията е малък.

pOP9 е плазмид с голям брой на копията при всички температури, конструиран чрез инсериране в pBR322 на ecoRI/PruII начало на репликация от плазмида pOP6 тип Col E1 / 44/. Преди инсерцията този фрагмент се модифицира, както следва. Смилат се 50 мкг pOP6 напълно с по 20 ед. от BamHI и CcrI. За да бъдат премахнати CcrI 3' стърчащите краища и за да се запълнят 5' BamHI краищата, смляната pOP6 ДНК се обработва с ДНК полимераза I /Klenov/ на E.coli в двустепенна реакция - първо при 20°C за елиминиране на CcrI 3' стърчащите краища и след това при 9°C за запълване на 5' края. Полученият фрагмент с тъпи краища се обработва с рестриктаза и 0,02 пикомола от него се използват за трансформация на компетентни DG75 клетки /45/. Трансформанти се отбират на петрита, съдържащи 50 мкг/мл ампицилин и скринирани за 3,3 кб делеция, загуба на CcrI мястото и наличие на новообразувано BamHI място.

Един от плазмидите, означен като pOP7, се избира и BamHI мястото се премахва чрез смилане на 25 мкг от pOP7 с 20 ед. BamHI, запълват се краищата с E.coli ДНК полимераза I Klenow фрагмент и религиране с T4 ДНК лигаза. Компетентни DG75 клетки се третират с 0,1 мкг от тази ДНК и трансформантите се отбират на L петрита, съдържащи 50 мкг/мл ампицилин. Колониите се скринират за загуба на BamHI рестриктазното място. Така се селекционира pOP8. За получаването на pOP9 от pBR322 се изолира AvaI запълнен /EcoRI Tet^{pes} фрагмент и се лигира към изолиране PruII частично/EcoR_ 3560 нд фрагмент от pOP8.

При лигирането на 1,42 кб EcoRI/AvaI-запълнен Tet^{pes} /фрагмент А/ и 3,56 кб EcoRI/PvuII Anp^{pes} /фрагмент В/ се използва 0,5 мкг от фрагмент В и 4,5 мкг от фрагмент А в

BAD ORIGINAL

двустъпална реакция, за да се благоприятства междумолекулното лигиране на EcoRI краищата.

Компетентни DG75 клетки се трансформират с 5 мсл от лигазната смес и трансформантите се отбират на ампицилин / 50 мкг/мл/ съдържащи петрита. pOP9, изолиран от Amp^R Tet^R трансформати, показа висок брой на копията, резистентност към колицин и наличие на единични рестриктазни места за EcoRI, BamHI,, PvuII, HindIII, 2 рестриктазни места за HincCC и подходящо големи фрагменти при смилане с HaeIII.

За получаване на pCS3, 50 мкг pEW27 ДНК се смила напълно с PvuII и EcoRI. По същия начин 50 мкг от pOP9 се разгражда с PvuII и EcoRI и се изолира 3,3 кб фрагментът.

0,36 мкг /0,327 пикол/ от pEB27 фрагмента и 0,35 mg /0,16 пикомол/ от pOP фрагмента се лигитират и лигазната смес се използва за трансформация на E.coli MM294. Отбират се Amp^R Tet^R трансформанти. Тези колонии първоначално се скринират при 30°C и 41°C на петри за анализ на беталактамазна активност, а след това се изследва и тяхната плазмидна ДНК след растеж на 30°C и 41°C. Един от клоновете, дал положителни сигнали, се означава като pCS3 и се проверява чрез секвениране.

Д._.б. Получаване на P_LN_{R3S} инсерта. ДНК последователността, съдържаща P_L фаговия промотор и мястото за свързване на рибозомите за N-гена /N_{RBS}/, се получава от pFC5, плазмид, производен на pKC30, описан от Шиматаке и Розенберг /46/. pKC30 съдържа 2,34 кб фрагмент от ламбдафага, клониран в HadIII-BamHI фрагмента на pBR322. P_L промоторът и N_{RBS} представляват участък в pKC30 между BgLII и HpaI сойтовете. Производният плазмид на pKC30 има EcoRI сайт, вместо BgLII сайт.

BgLII сайт, разположено непосредствено преди P_L промотора, се превръща в EcoRI място по следващия начин. pKC30 се разгражда с BgLII краищата, запълнени с Klenow и $dNTP_S$ и се лигира чрез T4 лигаза към EcoRI линкер /получени от New England Biolabs / и се трансформира в E.coli K12 щам MM294 Ламбда$^+$. Плазмиди се изолират от Amp^R Tet^S трансформанти и желаната последователност се потвърждава чрез рестриктазен анализ и секвениране. Полученият плазмид, pFC, е двойноразграден с PvuI и HpaI, при което се изолира около 540 нд фрагмент, който се обработва с Klenow и dATP и S1 нуклеаза до получаването на фрагмент с тъпи краища, притежаващ на 3' края последователността AGGAGAA, където - AGGAGA представлява N_{RBS}. Този фрагмент се обработва с EcoRI за получаването на 347 на ДНК фрагмент с 5'-EcoRI /леплив/ и HindI/ частично запълване, S1 тъп/-3' краища.

За карйното получаване на pFC5, pBI-Z15 се използва за въвеждане на XindIII място на 3' край на N_{RBS}. pBI-Z15 се депозира на 13.01.1984 г., ATCC № 39578, и се получава чрез свързване на последователност, съдържаща ATC плюс 140 вр от бетаинтерфероновия ген към lac z гена в pBR322. В pBI-Z15 EcoRI сайта на pBR322 е запазено и инсертът съдържа HindIII сайта, непосредствено преди ATC иницииращия кодон на интерфероновия ген. pBI-Z15 се обработва с HindIII краищата, запълнени с Klenow и dNTF и след това се разгражда EcoRI. Полученият EcoRI/HindIII /запълнен/ векторен фрагмент се лигира с посочения по-горе EcoRI/HindI /запълнен/ фрагмент и лигазната смес се трансформира в MC1000-39531. Трансформимантите, съдържащи правилната конструкция, се идентифицират чрез способността им да растат на минимална среда без лактоза при 34°C, но не и при 30°C, но не и при 30°C./ Трансформациите се посяват на x-gal-Amp петрита при 30°C и 34° и на петрита с минимална лактоза среда при 30° и 34°. Трансформантите с правилната конструкция са сини на X-gal-Amp петрита и при двете температури, но на минималната лактозна среда растат само на 34°./ Правилната конструкция е означена с pFC5.

Д.9.в. Завършване на pPLOP.

pCS3 се модифицира, за да осигури P_L и H_{RBS} контролните последователности. pCS3 се разгражда HindIII и след това с EcoRI. Векторният фрагмент се лигира към EcoRI/ HindIII изолира фрагмент от pFC5, съдържащ P_LH_{RBS}, и се трансформира в E.coli MM294. Правилната конструкция от изолираната плазмидна ДНК се потвърждава чрез рестриктазен анализ и секвениране и плазмида се означава pPLOP.

Д.10. Конструиране на pTRP3.

pTRP3 се депозира с ATCC на

18.12.1984 г. и има кат. № 39946. Неговото конструиране е извършено в следващия ред.

За да бъде конструиран вектор, съдържащ trp контролните последователности след HindIII мястото, се изолира trp промотор/ оператор/място на свързване на рибозомите последователността без атенюаторната област от плазмида pVH153, получен от С.Яновски от Станфордския Университет. Trp последователности се съдържат в множество плазмиди, известни в тази област. pVH153 се обработва с HhaI (,който при скъсване дава 3' леплив край в 5' посока от trp промотор/, краищата се превръщат в слепи след обработка с Klenov, след което се извършва непълно смилане с TagI. 99 нд фрагментът, съответстващ на този, получен при скъсване в TagI мястото, разположено 6 нуклеотиди преди ATG старт кодона, се изолира и след това се лигира към обработения с EcoRI-запълнен/claI плазмид pBR322, при което се получава pTRP3.

Плазмидите, изброени по-нататък, са депозирани в Американската типова колекция за култури, Роквил МД, САЩ /ATCC/. Това депозиране се извършва съгласно условията на Будапещенския договор относно международните споразумения за депозиране на микроорганизми за нуждите на патентните процедури /Будапещенски договор/. Това осигурява поддържането на жизнена култура в продължение на 30 години от датата на депозиране. Организмите могат да се предоставят от ATCC при условията на Будапещенския договор при съответно споразумение между потребителя и ATCC, което осигурява непрекъсната наличност след публикуване на съответния американски патент. Наличността на депозираните щамове не трябва да се тълкува като лиценз, даващ правото да се използва практически изобретението и да се нарушават неговите права под егидата на всяко правителство и в съответствие с неговите патентни закони.

Плазмид	CMCC №	ATCC №	Дата на депозиране
pE4/E.coli MM294	2318	39894	15.10.1984
pAW711/E.coli DG95	2162	39918	8.11.1984
pAW736/E.coli DG95	2317	53092	10.04.1985
pAW742/E.coli DG95	2345	53161	21.06.1985
pAW741/E.coli DG95	2344	53162	21.06.1985
pAW739/E.coli DG95	2342	53163	21.06.1985
pAW737/E.coli DG95	2340	53164	21.06.1985
pAW740/E.coli DG95	2343	53165	21.06.1985
pAW731/E.coli DG95		53007	25.01.1985

Патентни претенции

1. Рекомбинантен човешки тумор некротизиращ фактор /TNF/.

2. Рекомбинантен TNF съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че съдържа аминокиселинната последователност, представена от позициите 17-157 в следващия ред.

```
   1 CACACCCTGACAAGCTGCCAGGCAGGTTCTCTTCCTCTCACATACTGACCCACGGCTCCA

  61 CCCTCTCTCCCCTGGAAAGGACACCATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCT
                                 METSerThrGluSerMETIleArgAspValGluLeu

 121 GGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTT
      AlaGluGluAlaLeuProLysLysThrGlyGlyProGlnGlySerArgArgCysLeuPhe

 181 CCTCAGCCTCTTCTCCTTCCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCA
      LeuSerLeuPheSerPheLeuIleValAlaGlyAlaThrThrLeuPheCysLeuLeuHis

 241 CTTTGGAGTGATCGGCCCCCAGAGGGAAGAGTCCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCC
      PheGlyValIleGlyProGlnArgGluGluSerProArgAspLeuSerLeuIleSerPro

 301 TCTGGCCCAGGCAGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGT
      LeuAlaGlnAlaValArgSerSerSerArgThrProSerAspLysProValAlaHisVal
                    1               6              11              16
 361 TGTAGCAAACCCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCCAATGCCCT
      ValAlaAsnProGlnAlaGluGlyGlnLeuGlnTrpLeuAsnArgArgAlaAsnAlaLeu
                   21              26              31              36
 421 CCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTA
      LeuAlaAsnGlyValGluLeuArgAspAsnGlnLeuValValProSerGluGlyLeuTyr
                   41              46              51              56
 481 CCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCTCCACCCATGTGCTCCT
      LeuIleTyrSerGlnValLeuPheLysGlyGlnGlyCysProSerThrHisValLeuLeu
                   61              66              71              76
 541 CACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGC
      ThrHisThrIleSerArgIleAlaValSerTyrGlnThrLysValAsnLeuLeuSerAla
                   81              86              91              96
 601 CATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGA
      IleLysSerProCysGlnArgGluThrProGluGlyAlaGluAlaLysProTrpTyrGlu
                  101             106             111             116
 661 GCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGAT
      ProIleTyrLeuGlyGlyValPheGlnLeuGluLysGlyAspArgLeuSerAlaGluIle
                  121             126             131             136
 721 CAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGC
      AsnArgProAspTyrLeuAspPheAlaGluSerGlyGlnValTyrPheGlyIleIleAla
                  141             146             151             156
 781 CCTGTGAGGAGGACGAACATCCAACCTTCCCAAACGCCTCCCCTGCCCCAATCCCTTTAT
      Leu...

 841 TACCCCCTCCTTCAGACACCCTCAACCTCTTCTGGCTCAAAAAGAGAATTGGGGGCTTAG

 901 GGTCGGAACCCAAGCTTAGAACTTTAAGCAACAAGACCACCACTTCGAAACCTGGGATTC

 961 AGGAATGTGTGGCCTGCACAGTGAAGTGCTGGCAACCACTAAGAATTCAAACTGGGGCCT

1021 CCAGAACTCACTGGGGCCTACAGCTTTGATCCCTGACATCTGGAATCTGGAGACCAGGGA

1081 GCCTTTGGTTCTGGCCAGAATGCTGCAGGACTTGAGAAGACCTCACCTAGAAATTGACAC

1141 AAGTGGACCTTAGGCCTTCCTCTCTCCAGATGTTTCCAGACTTCCTTGAGACACGGAGCC

1201 CAGCCCTCCCCATGGAGCCAGCTCCCTCTATTTATGTTTGCACTTGTGATTATTTATTAT

1261 TTATTTATTATTTATTTATTTACAGATGAATGTATTTATTTGGGAGACCGGGGTATCCTG

1321 GGGGACCCAATGTAGGAGCTGCCTTGGCTCAGACATGTTTTCCGTGAAAACGGAGGCTGA

1381 ACAATAGGCTGTTCCCATGTAGCCCCCTGGCCTCTGTGCCTTCTTTTGATTATGTTTTTT

1441 AAAATATTATCTGATTAAGTTGTCTAAACAATGCTGATTTGGTGACCAACTGTCACTCAT

1501 TGCTGAGGCCTCTGCTCCCCAGGGAGTTGTGTCTGTAATCGGCCTACTATTCAGTGGCGA

1561 GAAATAAAGGTTGCTTAGGAAAGAA
```


BAD ORIGINAL

3.TNF съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че има аминокиселинната последователност от претенция 2.

4. TNF съгласно претенция 1, характерзиращ се с това, че представлява безцистеинов мутеин.

5. TNF съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че същият е селекциониран от групата, състояща се от Δ 1-, Δ 3-, Δ 4-, Δ 5-, Δ 6-, Δ 8-, Δ 9- и Δ 10-TNF.

6. TNF съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че H-крайната последователност Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-His-Val.

7. TNF съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че има N-крайната последователност Val-Arg-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-Val-Ser-Val-Ala-Asn-Pro-(Gln)-(Ala)-Glu-Gly.

8. Рекомбинантна ДНК, кодираща за човешки TNF.

9. ДНК съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че кодираният TNF обхваща аминокиселинната последователност, представена с позиции 17-157 от претенция 2.

10. ДНК съгласно претенция 8, характеризираща се с това, че кодираният TNF има аминокиселинната последователност от претенция 2.

11. ДНК съгласно претенция 8, характеризираща се с това, че кодираният TNF представлява безцистеинов мутеин.

12. ДНК съгласно претенция 8, характеризираща се с това, че кодираният TNF е от групата на Δ 1-, Δ 3-, Δ 4-, Δ 5-, Δ 6-, Δ 8-, Δ 9- и Δ 10-TNF.

13. ДНК съгласно претенция 8, характеризираща се с това, че кодираният TNF има N-крайната последователност Ser-Asp-Lys-Pro.

14. ДНК съгласно претенция 8, характеризираща се с това, че кодираният TNF има N-терминалната аминокиселинна последователност Val-Arg-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-Val-Ser-Val-Ala-Asn-Pro—(Gln)-(Ala)-Gru-Gly.

15. Рекомбинантна ДНК съгласно претенция 8, характеризираща се с това, че съдържа контролни и кодиращи последователности, която ДНК при наличието на подходящи клетки гостоприемници може да предизвика експресия на ДНК съгласно претенциите 8-14.

16.Рекомбинантни клетки гостоприемници, трансформирани с ДНК съгласно претенциите от 8 до 14.

17. Метод за получаване на рекомбинантен тумор некрозиращ фактор / TNF/ характеризиращ се с това, че клетки гостоприемници, трансформирани с TNF ген, съдържащ подходящи регулаторни секвенции, се култивират при подходящи условия, в присъствие на необходими или подходящи за култивирането компоненти.

18. Вещество, предизвикващо туморна некроза при бозайници, в което активната съставка е TNF съгласно претенциите от 1 до 7.

19. Метод за лекуване на тумори чрез инжектиране в гостоприемника на ефективно антитуморно количество от рекомбинантен човешки тумор некротизиращ фактор съгласно претенциите от 1 до 7.

Приложение: 8 фигури

Литература

1. Carswell et al, Proc.Natl. Acad. Sci. (USA) (1975) 72: 3666.

2. Matthews et al, Brit. J. Cancer (1981) 44: 418.

3. Mannel et al, Infect. Immun (1980) 30:523; ibid (1981) 33:156.

4. Stone-Wolff et al, J.Exp.Med. (1984) 159:828.

5. Haidans et al, Infect. Immun. (1983) 42:385.

6. Shirai, T., et al, Nature (1985) 313: 803-806.

7. Gifford, G., et al, (personsl communication).

8. Laemmli et al, Nature (1970) 227:680.

9. Bolivar et al, Gene (1977) 2:95.

10. Chang et al, Nature (1977) 198:1056.

11. Geoddel et al,,Nucleic Acids Res. (1980) 8:4057.

12. Shimatake et al, Nature (1981) 292:128.

13. Broach, J.R., Meth. Enz. (1983) 101:307.

14. Stinchcomb et al, Nature (1979) 282:39.

15. Tschempe et al, Gene (1980) 10:157.

16. Clarke, L., et al, Meth. Enz. (1983) 101:300.

17. Hess et al, J Adv. Enzyme Reg. (1968) 7:149.

18. Holland et al, Biochemistry (1978) 17:4900.

19. Hitzeman et al, J. Biol. Chem. (1980) 255:2073.

20. Holland, M.J., et al, J. Biol. Chem. (1981) 256:1385.

21. Broach, J., et al,Gene (1978) 8:121.

22. Tissue Cultures, Academic Press, Cruz and Petterson, eds. (1973).

23. Fiers et al, Nature (1978) 273:113.

24. Depicker, A., et al, J. Mol. Appl. Gen. (1982) 1:561.

25. Cohen S.N., Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1972) 69:2110.

26. Maniatis et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1982) Cold Spring Haring Harbor Press, p254.

27. Shaw, C.H., et al, Gene (1983) 23:315.

28. Graham and van der Eb, Virosology (1978) 52:546.

29. Van Solingen, P., et al, J. Bact. (1977) 130:946.

30. Hsiao, C.L., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1979) 76:3829.

31. Methods in Enzymology _1980) 65:499-560.

32. Matteucci et al, J.Am. Chem. Soc. (1981) 103:3185.

33. Clewell, D.B., J.Bacteriol (1972) 110:667.

34. Sanger, F., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1977) 74:5463.

35. Messing et al, Nucleic Acids Res. (1981) 9:309.

36. Maxam et al, Methods in Enzymology (1980) 65:499.

37. Talmadge, K., et al., Gene (1980) 12:235.

38. Meselson, M., et al, Nature (1968) 217:1110.

39. Berger, S.L., et al, Biochem (1979) 18:5143.

40. Aviv, J., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1972) 69:1408-1412.

41. Okayama, H., et al, Mol. Cell. Biol. (1983) 3:280.

42. Payvar, F., et al, J. Biol. Chem. (1979) 254:7636-7642.

43. Wong, E. M., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1982) 79:3570.

44. Gelfand, D., et al, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) (1978) 75:5869.

45. O'Farrell, P., et al, J. Bacteriology (1978) 134: 645-654.

46. Shimatake and Rosenberg, Nature (1981) 292:128.

Издание на Патентното ведомство на Република България
София - 1113, бул. "Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Д. Мирчанова

Редактор: В. Алтаванова

Пор. 36681

Тираж: 40 СК

```
   1 CACACCCTGACAAGCTGCCAGGCAGGTTCTCTTCCTCTCACATACTGACCCACGGCTCCA

  61 CCCTCTCTCCCCTGGAAAGGACACCATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTGGAGCT
                                 METSerThrGluSerMETIleArgAspValGluLeu

 121 GGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAGACAGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGCTTGTT
      AlaGluGluAlaLeuProLysLysThrGlyGlyProGlnGlySerArgArgCysLeuPhe

 181 CCTCAGCCTCTTCTCCTTCCTGATCGTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTGCTGCA
      LeuSerLeuPheSerPheLeuIleValAlaGlyAlaThrThrLeuPheCysLeuLeuHis

 241 CTTTGGAGTGATCGGCCCCCAGAGGGAAGAGTCCCCCAGGGACCTCTCTCTAATCAGCCC
      PheGlyValIleGlyProGlnArgGluGluSerProArgAspLeuSerLeuIleSerPro

 301 TCTGGCCCAGGCAGTCAGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGT
      LeuAlaGlnAlaValArgSerSerSerArgThrProSerAspLysProValAlaHisVal
                    1           6          11          16
 361 TGTAGCAAACCCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCGCCGGGCCAATGCCCT
      ValAlaAsnProGlnAlaGluGlyGlnLeuGlnTrpLeuAsnArgArgAlaAsnAlaLeu
                   21          26          31          36
 421 CCTGGCCAATGGCGTGGAGCTGAGAGATAACCAGCTGGTGGTGCCATCAGAGGGCCTGTA
      LeuAlaAsnGlyValGluLeuArgAspAsnGlnLeuValValProSerGluGlyLeuTyr
                   41          46          51          56
 481 CCTCATCTACTCCCAGGTCCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCCCTCCACCCATGTGCTCCT
      LeuIleTyrSerGlnValLeuPheLysGlyGlnGlyCysProSerThrHisValLeuLeu
                   61          66          71          76
 541 CACCCACACCATCAGCCGCATCGCCGTCTCCTACCAGACCAAGGTCAACCTCCTCTCTGC
      ThrHisThrIleSerArgIleAlaValSerTyrGlnThrLysValAsnLeuLeuSerAla
                   81          86          91          96
 601 CATCAAGAGCCCCTGCCAGAGGGAGACCCCAGAGGGGGCTGAGGCCAAGCCCTGGTATGA
      IleLysSerProCysGlnArgGluThrProGluGlyAlaGluAlaLysProTrpTyrGlu
                  101         106         111         116
 661 GCCCATCTATCTGGGAGGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGACTCAGCGCTGAGAT
      ProIleTyrLeuGlyGlyValPheGlnLeuGluLysGlyAspArgLeuSerAlaGluIle
                  121         126         131         136
 721 CAATCGGCCCGACTATCTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTACTTTGGGATCATTGC
      AsnArgProAspTyrLeuAspPheAlaGluSerGlyGlnValTyrPheGlyIleIleAla
                  141         146         151         156
 781 CCTGTGAGGAGGACGAACATCCAACCTTCCCAAACGCCTCCCCTGCCCCAATCCCTTTAT
      Leu...

 841 TACCCCCTCCTTCAGACACCCTCAACCTCTTCTGGCTCAAAAAGAGAATTGGGGGCTTAG

 901 GGTCGGAACCCAAGCTTAGAACTTTAAGCAACAAGACCACCACTTCGAAACCTGGGATTC

 961 AGGAATGTGTGGCCTGCACAGTGAAGTGCTGGCAACCACTAAGAATTCAAACTGGGGCCT

1021 CCAGAACTCACTGGGGCCTACAGCTTTGATCCCTGACATCTGGAATCTGGAGACCAGGGA

1081 GCCTTTGGTTCTGGCCAGAATGCTGCAGGACTTGAGAAGACCTCACCTAGAAATTGACAC

1141 AAGTGGACCTTAGGCCTTCCTCTCTCCAGATGTTTCCAGACTTCCTTGAGACACGGAGCC

1201 CAGCCCTCCCCATGGAGCCAGCTCCCTCTATTTATGTTTGCACTTGTGATTATTTATTAT

1261 TTATTTATTATTTATTTATTTACAGATGAATGTATTTATTTGGGAGACCGGGGTATCCTG

1321 GGGGACCCAATGTAGGAGCTGCCTTGGCTCAGACATGTTTTCCGTGAAAACGGAGGCTGA

1381 ACAATAGGCTGTTCCCATGTAGCCCCCTGGCCTCTGTGCCTTCTTTTGATTATGTTTTTT

1441 AAAATATTATCTGATTAAGTTGTCTAAACAATGCTGATTTGGTGACCAACTGTCACTCAT

1501 TGCTGAGGCCTCTGCTCCCCAGGGAGTTGTGTCTGTAATCGGCCTACTATTCAGTGGCGA

1561 GAAATAAAGGTTGCTTAGGAAAGAA
```

FIG. 1

BAD ORIGINAL

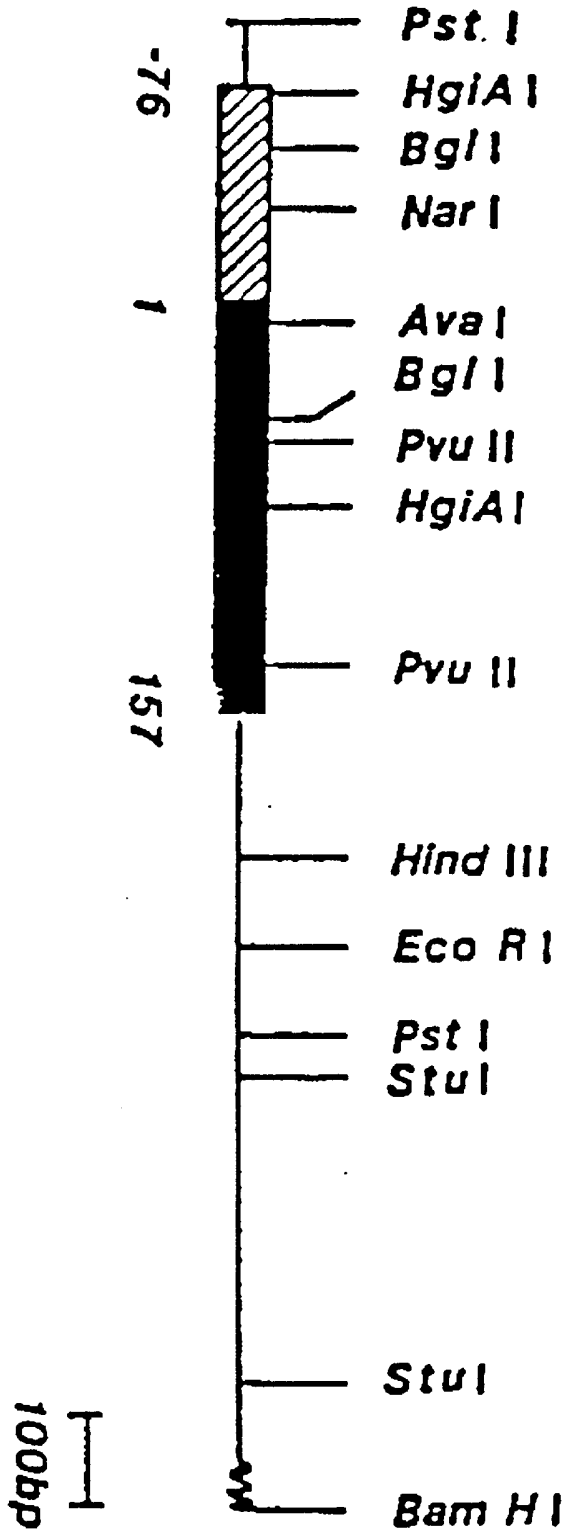


FIG. 2

BAD ORIGINAL

TNF Mutein	Plasmid	Oligomer
mTNF	pAW711	----------
V4	pAW736	CACTCGGGGTTCGAGACATAAGCTTTGCCTGGGCC
V5	pAW738	GCTTGTCACTCGGGGTTCGCATAAGCTTTGCC
V6	pAW739	GCTTGTCACTCGGGGTCATAAGCTTTGCC
V7	pAW737	CAGGCTTGTCACTCGGCATAAGCTTTGCCTGGGCC
V8	pAW740	CTACAGGCTTGTCACTCATAAGCTTTGCCTGGGCC
V9	pAW741	GGGCTACAGGCTTGTCCATAAGCTTTGCCTGGGCC
V10	pAW742	CATGGGCTACAGGCTTCATAAGCTTTGCCTGGGCC
V11	pAW743	CAACATGGGCTACAGGCATAAGCTTTGCCTGGGCC
V15	pAW744	GAGGGTTTGCTACAACCATAAGCTTTGCCTGGGCC
V156-	pAW745	GATGTTCGTCCTCCTCAGGCAATGATCCCAAAG
V150-	pAW746	GTATGTTCGTCCTCCTCAGACCTGCCCAGACTCGGC
V140-	pAW747	GTATGTTCGTCCTCCTCAGTCGGGCCGATTGATCTC
$desSer_3desSer_4$	pAW733	GGGTTCGAGAACGGACCATAAGC
$Val_{15}Ser_{16}$	pAW734	GTTTGCTACAGAAACGGCTAC

FIG. 3

BAD ORIGINAL

FIG. 4

RELATIVE BIOACTIVITIES ON TNF MUTEINS VS. PARENT pAW 711

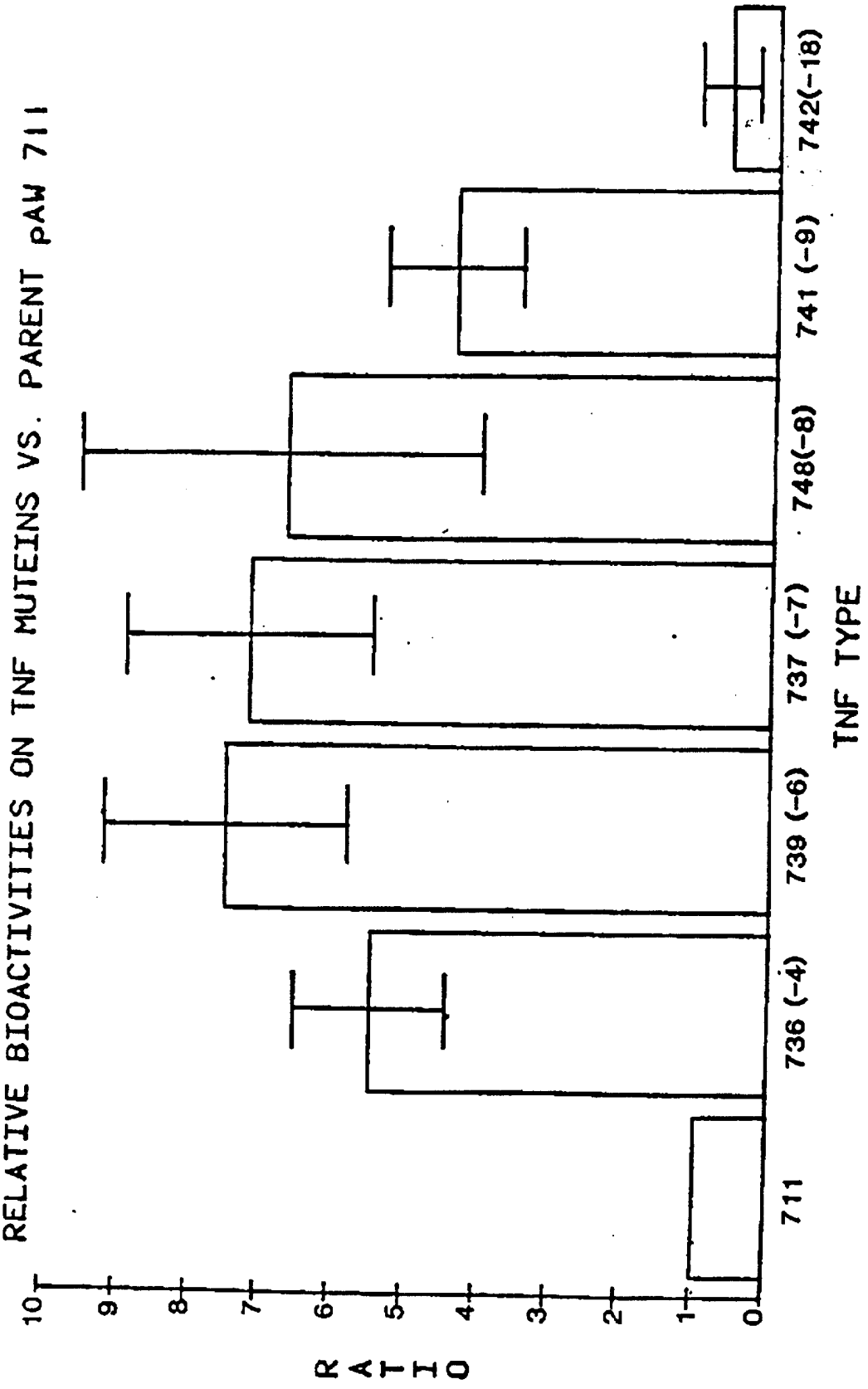
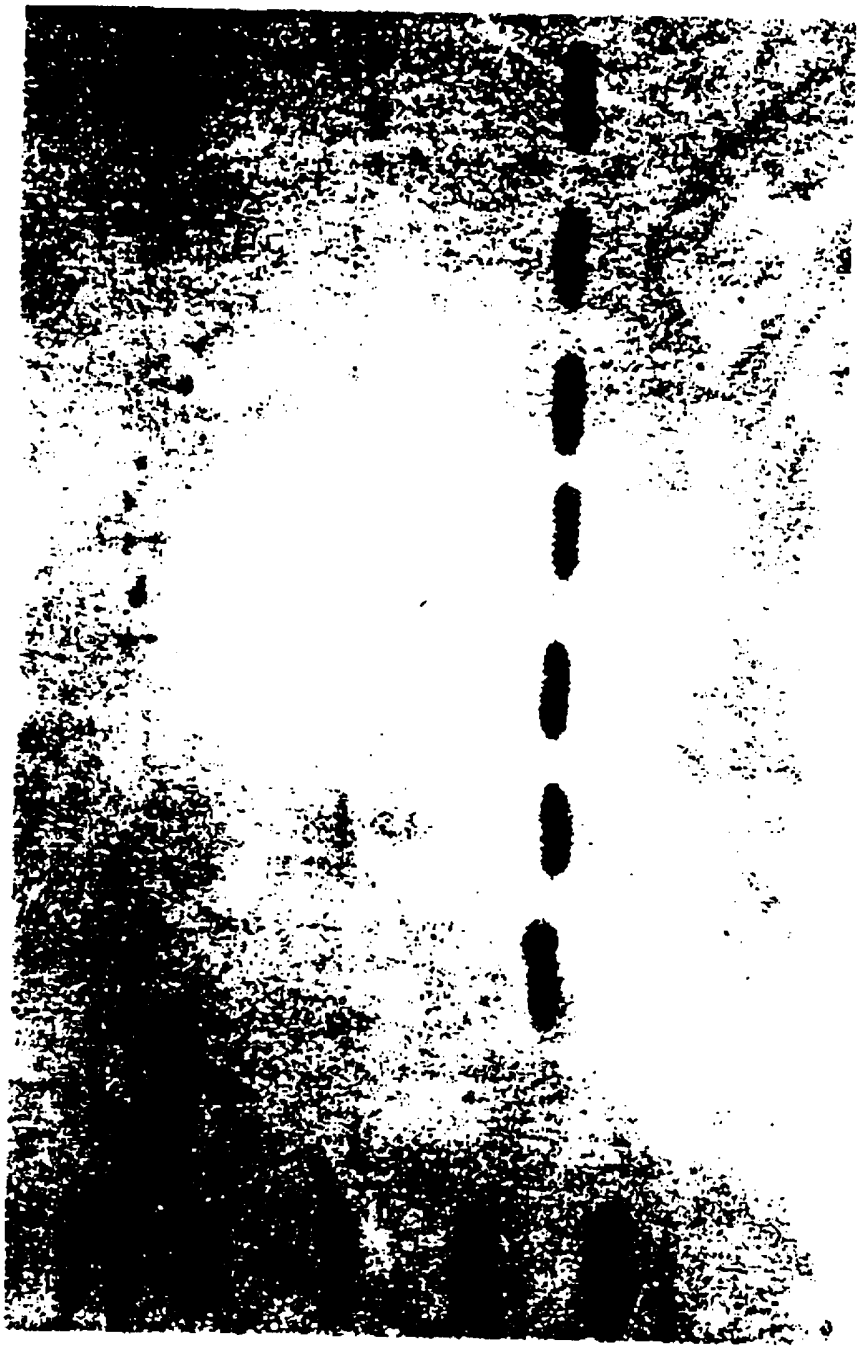
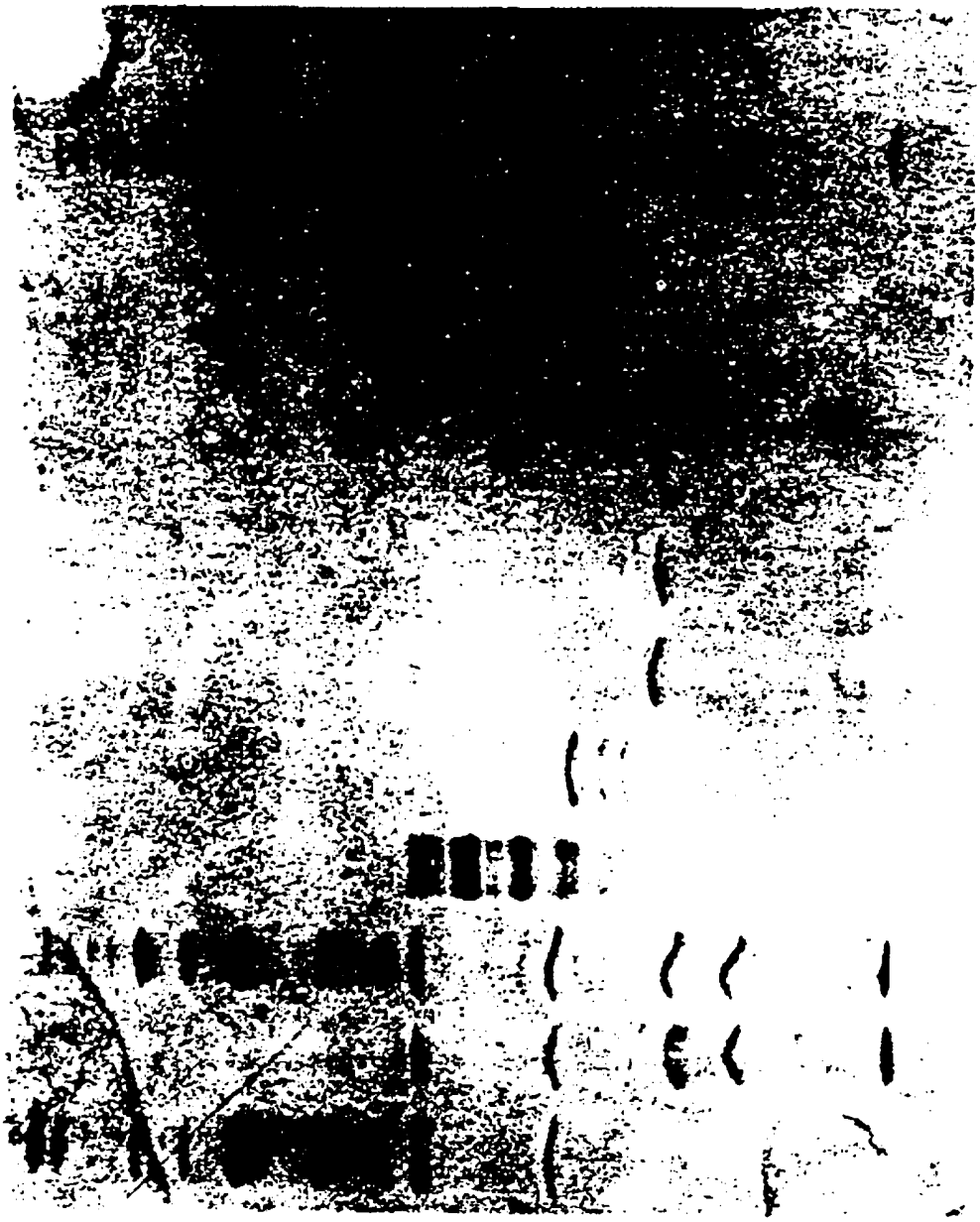


FIG. 5



BAD ORIGINAL

FIG. 6



BAD ORIGINAL

FIG. 7a EFFICACY: rTNF ON 9 DAY MURINE FIBROSARCOMA

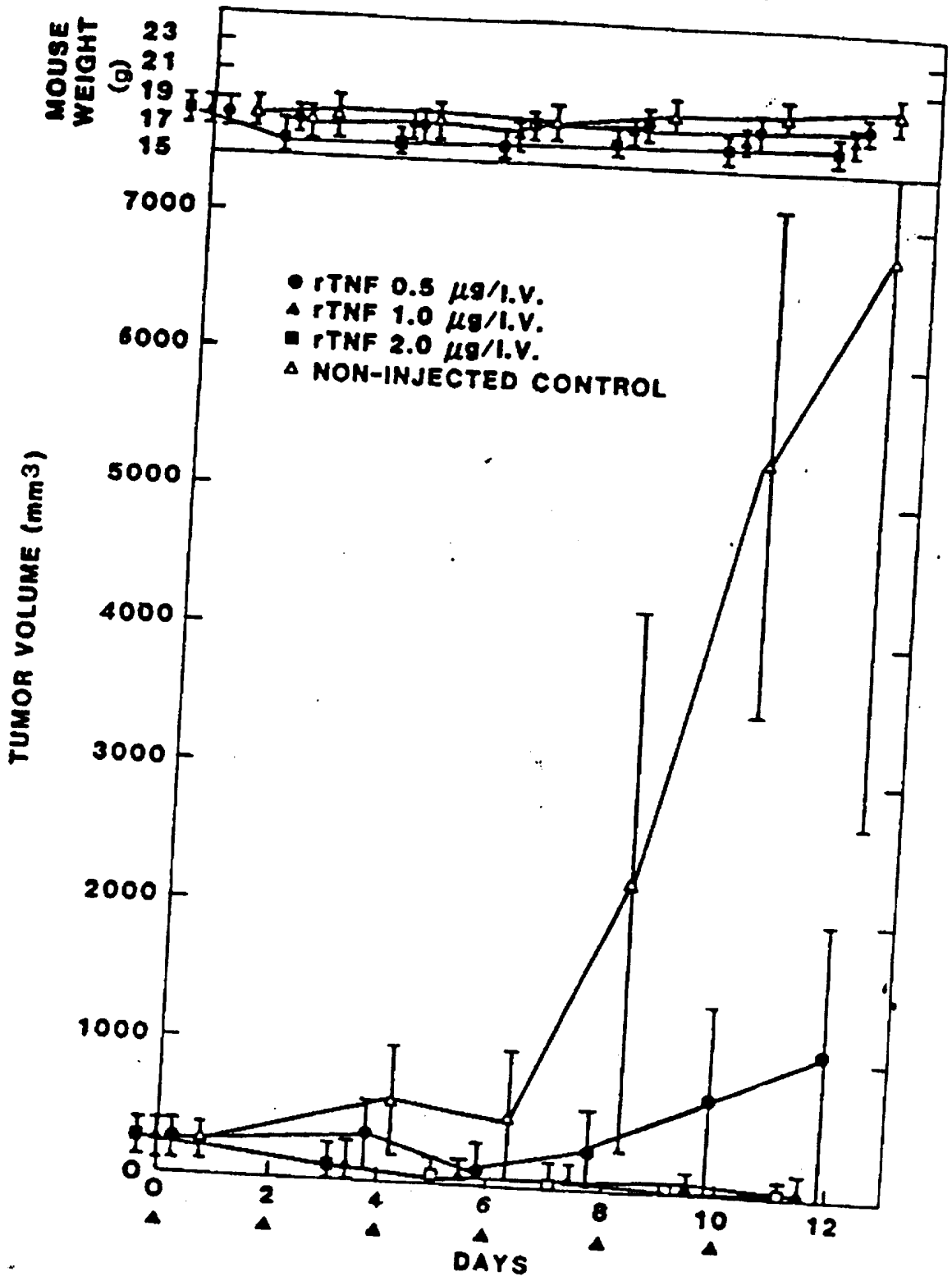
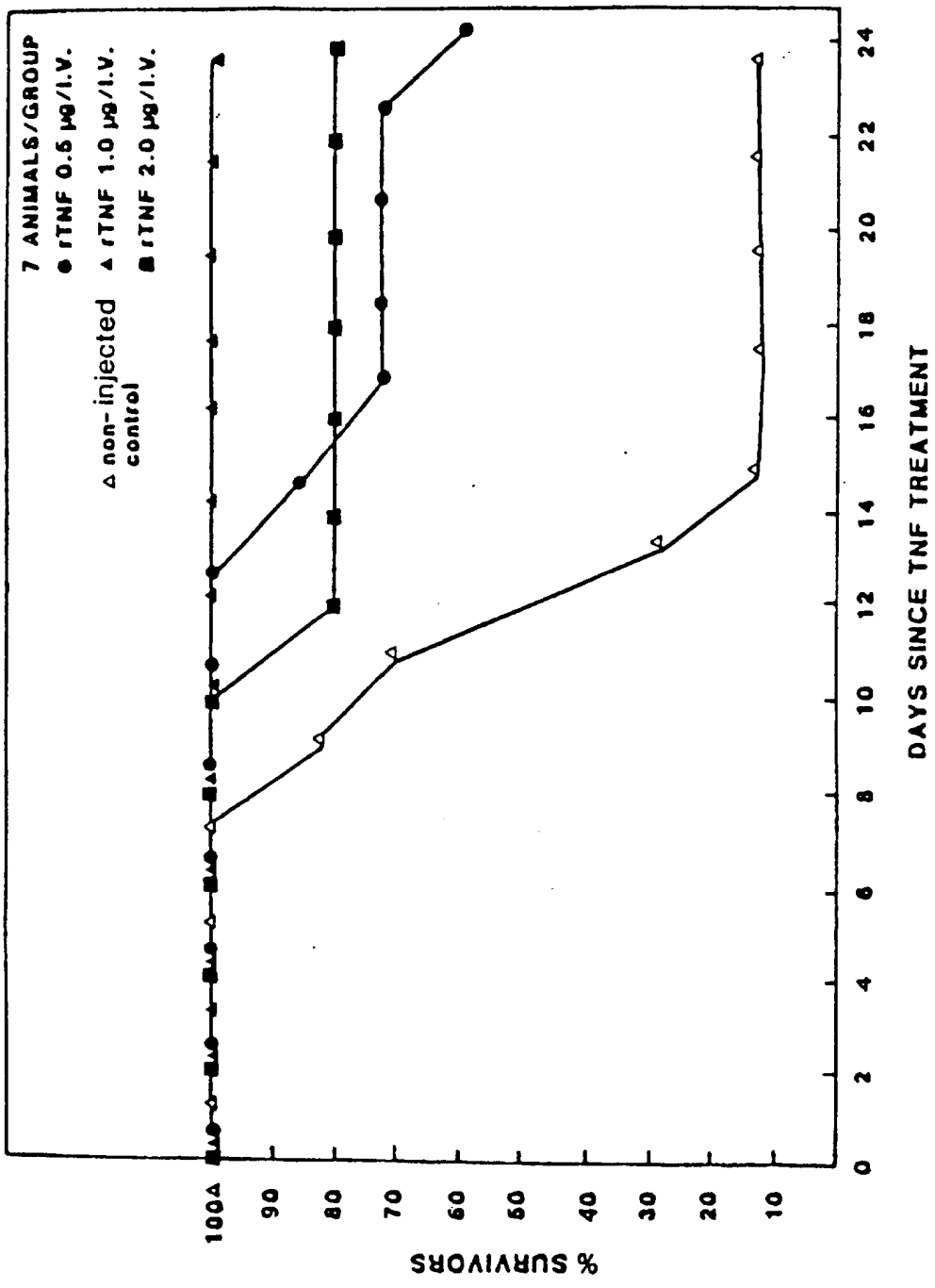



FIG. 7b ANIMALS WITH MURINE FIBROSARCOMA SURVIVING SINCE TNF TREATMENT