

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

202 921 B

(21) A bejelentés száma: 828/85
(22) A bejelentés napja: 1985.03.05.
(30) Elsőbbségi adatok:
043 617/841984.03.06. JP
172 307/841984.08.17. JP
(83) Letétbe helyezés: ATCC 31244; ATCC 33694; ATCC
39403; CCL1; CCL1.2

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/28

A 61 K 37/02

C 12 N 15/70

(40) A közzététel napja: 1986.03.28.

(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1991.04.29. SZKV 91/04

(72) Feltalálók:

Furutani, Yasuji, Toyonaka-shi (JP)
Notake, Mitsue, Suita-shi (JP)
Yamada, Masaaki, Kyoto-shi (JP)
Yamagishi, Juniti, Toyonaka-shi (JP)

(73) Szabadalmas:

Dainippon Pharmaceutical Co. Ltd., Osaka (JP)

(54) **Eljárás humán tumor nekrosis faktort kódoló DNS, továbbá annak alkalmazásával a fenti faktornak megfelelő polipeptid, és hatóanyagként egy fenti polipeptidet tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására**

(57) KIVONAT

A humán tumor nekrosis faktor polipeptidet, vagy annak biológiailag aktív részét kódoló bázisszekvenciával rendelkező, vagy egy fenti bázisszekvenciát tartalmazó DNS-t a találmány értelmében úgy állítják elő, hogy humán makrofágokat indukálószer(ek)kel együtt tenyésztenek, a makrofágokból elválasztják a humán tumor nekrosis faktor mRNS-t tartalmazó frakciót, a frakcióból cDNS génállományt készítenek és a génállományból a humán tumor nekrosis faktort, vagy annak aktív részét kódoló cDNS-t klónozzák.

A kapott klónozott cDNS-t oly módon használják fel a humán tumor nekrosis faktor polipeptid, vagy annak biológiailag aktív része előállítására, hogy a klónozott cDNS-t expressziós vektorba illesztik, a rekombináns vektort E.coli gazdaszervezetbe viszik, a transzformált E.colit tenyésztik, és a tenyészetből kinyerik a humán tumor nekrosis faktor polipeptidet, vagy annak aktív részét.

A humán tumor nekrosis faktor polipeptid tumoros sejtekkel szembeni szelektív nekrotikus hatást mutat, a fenti hatása következtében gyógyszerkészítmények hatóanyagaként daganatellenes szerként használható.

A leírás terjedelme: 40 oldal (ezen belül 5 ábra)

HU 202 921 B

A találmány tárgya eljárás

- 1) humán tumor nekrozis faktor polipeptidnek, vagy annak fő részének vagy részeinek, vagy a humán nekrozis faktor polipeptidet kódoló DNS allél mutánsból származó polipeptidnek – továbbiakban allél mutáns polipeptid – megfelelő bázisszekvenciát tartalmazó DNS, előállítására;
- 2) a fenti DNS-t tartalmazó vektor előállítására, a vektor gazdaszervezetbe való bevitelére, és ennek segítségével a DNS-nek megfelelő polipeptid – azaz a humán tumor nekrozis faktornak, vagy annak fő részének vagy részeinek megfelelő polipeptid, vagy egy humán tumor nekrozis faktorhoz hasonló anyag, vagy annak fő része vagy részei, – előállítására a gazdaszervezetben;
- 3) a fenti polipeptidet vagy anyagokat tartalmazó tumorelleses hatású gyógyszerkészítmények előállítására.

Carswell és munkatársai felfedezték, hogy a Calmette-Guérin bacillussal (BCG) fertőzött, majd endotoxinnal kezelt egerek széruma olyan anyagot tartalmaz, amely előli a transzplantált Meth A szarkómát. A fenti anyagot tumor nekrozis faktornak – továbbiakban TNF – nevezték el [Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 72, 3666 (1975)].

A TNF-et egy, a makrofágokból felszabaduló, fiziológiailag aktív anyagnak tekintik, amelyre az jellemző, hogy

- i) ha bizonyos fajta tumort – például Meth A szarkómát – hordozó állatnak beadják, a tumort elpusztítja, és az állat meggyógyul;
- ii) bizonyos fajta tumorsejtekkel – például egér L-sejt – szemben in vitro citotoxikus hatást mutat, míg a normál sejteket alig károsítja; és
- iii) aktivitása nem faj-specifikus állatban.

Fenti tulajdonságai következtében a TNF-et mint új típusú tumorelleses szert érdemes kifejleszteni.

TNF-et, illetve TN-szerű anyagot ismertettek az alábbi irodalmi helyeken:

Green és munkatársai: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 73, 381 (1976); Matthews és munkatársai: Br. J. Cancer, 42, 416 (1980); Ruff és munkatársai: J. Immunol., 125, 1671 (1980); Männel és munkatársai: Infect. Immun., 28, 204 (1980); Haranaka és munkatársai: Japan J. Exp. Med., 51, 191 (1981); továbbá a 90892 és 86475 közzétételi számú európai szabadalmi leírásban és a 21621/1983 közzétételi számú japán szabadalmi leírásban.

A fenti irodalmi helyeken ismertett leírások szerint a TNF-et nyúl, egér, hörcsög vagy tengerimalac szövetekből vagy test-folyadékokból – például vérből – állítják elő, tisztítással. A termékeket azonban nem definiálják pontosan, és nyilvánvalóan különböző korlátai is vannak ezeknek az eljárásoknak, a nyersanyagforrások és a végtermék tisztaságának tekintetében.

Immunológiai szempontból klinikai alkalmazásra humán eredetű TNF lenne a legmegfelelőbb tumorelleses szer. A fenti ismert eljárásokat azonban nem lehet humán TNF előállítására alkalmazni.

Humán eredetű tumorelleses hatású citotoxinként

ismertek a humán perifériás monociták és humán mielociták monocita leukémia sejtek által termelt citotoxinok [Matthews: Immunology, 44, 135 (1981)]; humán perifériás vérsejtekhez tartozó sejtek által termelt citotoxinok [Reed és munkatársai: J. Immunol., 115, 395 (1975)]; és a humán B-sejt-vonalak által termelt citotoxinok [Williamson és munkatársai: Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 80, 5397 (1983)]. A fenti anyagok citotoxikus aktivitással rendelkeznek, de nincsenek világosan definiálva ezek sem.

A találmány szerinti, rekombináns DNS technológián alapuló eljárással sikerült a humán TNF polipeptidet kódoló cDNS-t klónozni. A kutatások során azt is kimutattuk, hogy a humán TNF cDNS kódolja a prekursor polipeptidet is. A találmány szerinti eljárással sikerült továbbá egy gazdaszervezetbe bevitt, klónozott humán TNF cDNS-t tartalmazó expressziós vektor segítségével a gazdaszervezetben humán TNF polipeptidet előállítani, és azt a homogenitás eléréséig tisztítani.

A leírásban az egyszerűség kedvéért az alábbi rövidítéseket alkalmazzuk.

A	adenin
C	citozin
G	guanin
T	timin
Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	aszparagin
Asp	aszparaginsav
Cys	cisztein
Gln	glutamin
Glu	glutaminsav
Gly	glicin
His	hisztidin
Ile	izoleucin
Leu	leucin
Lys	lizin
Met	metionin
Phe	fenilalanin
Pro	prolin
Ser	szerin
Thr	treonin
Trp	triptofán
Tyr	tirozin
Val	valin
DNS	dezoxiribonukleinsav
cDNS	komplementer DNS
sscDNS	egyszálú cDNS
dscDNS	kettős szálú DNS
RNS	ribonukleinsav
mRNS	messenger-RNS
poli(A)mRNS	poli(A)-t tartalmazó mRNS
dATP	dezoxiadenozin-trifoszfát
dCTP	dezoxicitidin-trifoszfát
dGTP	dezoxiguanozin-trifoszfát
dTTP	dezoxitimidin-trifoszfát
oligo(dC)	oligodezoxicitidinsav
oligo(dG)	oligodezoxiguanylsav
oligo(dT)	oligodezoxitimidilsav

poli(A)	poliadenilsav
poli(U)	poliuridilsav
poli(dC)	polidezoxicitidilsav
poli(dG)	polidezoxiguanilsav
ATP	adenozin-trifoszfát
EDTA	etiléndiamin-tetraecetsav
kb	kilobázis (ezer bázis)
kbp	kilobázispár
bp	bázispár
Meth A szarkóma	metil-kolantrénrel indukált szarkóma
TNF	tumor nekrosisz faktor
rHu-TNF	rekombináns humán TNF

A leírásban az egyszálú bázisszekvencia az értelmes szál bázisszekvenciáját jelenti, és a bal vége az 5'-vég, a jobb oldali a 3'-vég. Az aminosavszekvenciában a bal oldali vég az N-terminális, a jobb oldali vég a C-terminális.

A találmány szerinti eljárást részleteiben, az előzményeket is beleértve az alábbiakban ismertetjük.

[I-1] Nyúl TNF-et kódoló DNS, és a nyúl TNF

Rekombináns DNS technológiát alkalmazva sikerült kutatásaink során klónozni a nyúl TNF-et kódoló cDNS-t, és felderíteni a nyúl TNF szerkezetét. Közlebről, nyúl makrofágokat in vitro megfelelő indukáló anyagokkal együtt tenyésztettünk, megbizonyosodtunk róla, hogy nyúl TNF keletkezett és a táptalajba ürült. Ezt követően olyan tenyésztési körülményeket kerestünk, amelyek között a makrofágokban nagy koncentrációban képződött és felhalmozódott a nyúl TNF

mRNS. Ezután sikerült klónoztunk a nyúl TNF-et kódoló cDNS-t, és meghatároztunk bázisszekvenciáját, és azt is kimutattuk, hogy a nyúl TNF mint prekursor keletkezik. Sikerült továbbá klónozott cDNS-t hordozó expressziós vektort bevinnünk egy gazdaszervezetbe, és ott nyúl TNF-et termelni.

A nyúl TNF-et kódoló cDNS-t és a nyúl TNF-et részletesen például a 677 680 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás és a 84 114 325.8 számú európai szabadalmi leírás ismerteti. Lényegüket az alábbiakban foglalhatjuk össze.

A biológiaiailag aktív nyúl TNF-et kódoló jellegzetes DNS-szekvenciát az 1-1. táblázatban közölt (1-1) képlet jellemzi.

Az (1-1) képletű bázisszekvenciával rendelkező DNS az 1-2. táblázatban közölt (1-2) képletű polipeptidet kódolja.

A nyúl TNF-et kódoló DNS kódolja a nyúl TNF egy prekursorát. A nyúl TNF prekursorát kódoló jellegzetes DNS szerkezetét a 2-1. táblázatban megadott (2-1) képlet jellemzi, vagy egy olyan DNS, amelyet úgy kapunk, hogy a DNS 5'-végéhez egy ATG tripletet adunk.

A (2-1) képletű bázisszekvenciát tartalmazó DNS a 2-2. táblázatban ismertetett (2-2) képletű polipeptidet kódolja.

Az (1-2) képletű aminosavszekvenciával rendelkező polipeptid, azaz a biológiaiailag aktív nyúl TNF nem faj-specifikus, és tumorelles szerként használható, mivel tumorsejtekkel szemben szelektív citotoxikus hatást fejt ki, és tumoros állatokban a tumort visszafejljeszti.

1-1. táblázat: (1-1) képletű DNS-szekvencia

(5')-	TCA	GCT	TCT	CGG	GCC	CTG	AGT	GAC	AAG
CCT	CTA	GCC	CAC	GTA	GTA	GCA	AAC	CCG	CAA
GTG	GAG	GGC	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	AGC	CAG
CGT	GCG	AAC	GCC	CTG	CTG	GCC	AAC	GGC	ATG
AAG	CTC	ACG	GAC	AAC	CAG	CTG	CTG	GTG	CCG
GCC	GAC	GGG	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	TCC	CAG
GTT	CTC	TTC	AGC	GGT	CAA	GGC	TGC	GCG	TCC
TAC	GTG	CTC	CTC	ACT	CAC	ACT	GTC	AGC	CGC
TTC	GCC	GTC	TCC	TAC	CCG	AAC	AAG	GTC	AAC
CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	AGC	CCC	TGC	CAC
CGG	GAC	ACC	CCC	GAG	GAG	GCT	GAC	CCC	ATG
GCC	TGG	TAC	GAG	CCC	ATC	TAC	CTG	GGC	GGC
GTC	TTC	CAG	TTG	GAG	AAG	GGT	GAC	CGG	CTC
AGC	ACC	GAG	GTC	AAC	CAG	CCT	GAG	TAC	CTG
GAC	CTT	GCC	GAG	TCC	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT
GGG	ATC	ATT	GCC	CTG-(3')					

1-2. táblázat: (1-2) képletű polipeptid

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

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

2-1. táblázat: (2-1) képletű DNS-szekvencia

(5')-	AGC	ACT	GAG	AGT	ATG	ATC	CGG	GAC	GTC
GAG	CTG	GCG	GAG	GGG	CCG	CTC	CCC	AAG	AAG
GCA	GGG	GGG	CCC	CAG	GGC	TCC	AAG	CGC	TGC
CTC	TGC	CTC	AGC	CTC	TTC	TCT	TTC	CTG	CTC
GTG	GCT	GGA	GCC	ACC	ACG	CTC	TTC	TGC	CTG
CTG	CAC	TTC	AGG	GTG	ATC	GGC	CCT	CAG	CAG
GAA	GAG	CAG	TCC	CCA	AAC	AAC	CTC	CAT	CTA
GTC	AAC	CCT	GTG	GCC	CAG	ATG	GTC	ACC	CTC
AGA	TCA	GCT	TCT	CGG	GCC	CTG	AGT	GAC	AAG
CCT	CTA	GCC	CAG	GTA	GTA	GCA	AAC	CCG	CAA
GTG	GAG	GGC	CAG	CTC	CAG	TGG	CTG	AGC	CAG
CGT	GCG	AAC	GCC	CTG	CTG	GCC	AAC	GGC	ATG
AAG	CTC	ACG	GAC	AAC	CAG	CTG	GTG	GTG	CCG
GCC	GAC	GGG	CTG	TAC	CTC	ATC	TAC	TCC	CAG
GTT	CTC	TTC	AGC	GGT	CAA	GGC	TGC	CGC	TCC
TAC	GTG	CTC	CTC	ACT	CAC	ACT	GTC	AGC	CGC
TTC	GCC	GTC	TCC	TAC	CCG	AAC	AAG	GTC	AAC
CTC	CTC	TCT	GCC	ATC	AAG	AGC	CCC	TGC	CAC
CGG	GAC	ACC	CCC	GAG	GAG	GCT	GAG	CCC	ATG
GCC	TGG	TAC	GAG	CCC	ATC	TAC	CTG	GGC	GGC
GTC	TTC	CAG	TTG	GAG	AAG	GGT	GAC	CGG	CTC
AGC	ACC	GAG	GTC	AAC	CAG	CCT	GAG	TAC	CTG
GAC	CTT	GCC	GAG	TCC	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT
GGG	ATC	ATT	GCC	CTG-(3')					

2-2. táblázat: (2-2) képletű polipeptid

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

A 3. táblázatban látható a nyúl TNF-et kódoló cDNS-nak megfelelő bázisszekvencia egy példája. A 2-1. táblázatban látható bázisszekvencia a 3. táblázatban közölt bázisszekvencia 37-738. bázisának felel

meg. Az első 15 bázis egy oligo(dG)-végcsoport, melyet a cDNS-nek a vektorba való illesztése céljából adtunk a molekulához.

3. táblázat: cDNS bázisszekvenciája

10	20	30	↓ HaeII 40	50	60
GGGGGGGGGG	GGGGGCCCTC	TGGAGAGAGC	GCCATGAGCA	CTGAGAGTAT	GATCCGGGAC
CCCCCCCCCC	CCCCCGGAG	ACCTCTCTCG	CGGTACTCGT	GACTCTCATA	CTAGGCCCTG
70	80	90	100	110	120
GTCGAGCTGG	CGGAGGGGCC	GCTCCCCAAG	AAGGCAGGGGG	GGCCCCAGGG	CTCCAAGCGC
CAGCTCGACC	GCCTCCCCGG	CGAGGGGTTC	TTCCGTCCCC	CCGGGGTCCC	GAGGTTTCGG
130	140	150	160	170	HaeII 180
TGCCTCTGCC	TCAGCCTCTT	CTCTTTCCTG	CTCGTGGCTG	GAGCCACCAC	GCTCTTCTGC
ACGGAGACGG	AGTCGGAGAA	GAGAAAGGAC	GAGCACCGAC	CTCGGTGGTG	CGAGAAGACG
190	200	210	220	230	240
CTGCTGCACT	TCAGGGTGAT	CGGCCCTCAG	GAGGAAGAGC	AGTCCCCAAA	CAACCTCCAT
GACGACGTGA	AGTCCCACTA	GCCGGGAGTC	CTCCTCGCTC	GTCAGGGGTT	TGTTGGAGGTA
250	260	270	280	AvaI 290	300
CTAGTCAACC	CTGTGGCCCA	GATGGTCACC	CTCAGATCAG	CTTCTCGGGC	CCTGAGTGAC
GATCAGTTGG	GACACCGGGT	CTACCACTGG	GAGTCTAGTC	GAAAGAGCCG	GAACCTACTG
310	320	330	340	350	360
AAGCCTCTAG	CCCACGTAGT	AGCAAACCCG	CAAGTGGAGG	GCCAGCTCCA	GTGGCTGAGC
TTCGGAGATC	GGGTGCATCA	TCGTTTGGGC	GTTACCTCC	CGGTCGAGGT	CACCGACTCG
370	380	390	400	410	420
CAGCGTGCGA	ACGCCCTGCT	GGCCAACGGC	ATGAAGCTCAC	GGACAACCA	GCTGGTGGTG
GTCGCACGCT	TGCGGGACGA	CCGTTGCCG	TACTTCGAGT	GCCTGTTGGT	CGACCACCAC

3. táblázat (folytatás)

430	440	450	460	470	480
CCGGCCGACGGGCTGTACCTCATCTACTCCAGGTTCTCTT	CAGCGGTC	AAGGCTGCCG	GGCCGGCTGCCGACATGGAGTAGATGAGGGTCCAAGAGAAGTCGCCAGTTCCGACGGCG		
490	500	510	520	530	540
TCCTACGTGCTCCTCACTCACTGTCTAGCCGCTTCGCCGTCTCCTACCCGAACAAGGTC					
AGGATGCACGAGGAGTGAGTGTGACAGTCGGCGAAGCGGCAGAGGATGGGCTTGTTCCAG					
550	560	570	580	590	600
AACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCTGACCACGGGAGACCC	CGAGGAGGCTGAGCC				
TTGGAGGAGAGACGGTAGTTCTCGGGGACGGTGGCCCTCTGGGGCTCTCCGACTCGGG					
610	620	630	640	650	660
ATGGCCTGGTACGAGCCCATCTACCTGGGCGGCGTCTTCCAGTTGGAGAAAGGGTGACCGG					
TACCGGACCATGCTCGGGTAGATGGACCCGCCGAGAAAGGTCAACCTCTTCCCACTGGCC					
670	680	690	700	710	720
CTCAGCACCGAGGTCAACCAGCCTGAGTACCTGGACCTTGCCGAGTCCGGGCAGGTCTAC					
GAGTCGTGGCTCCAGTTGGTGGACTCATGGACCTGGAACGGCTCAGGCCCCGTCCAGATG					
730	740	750	760	770	780
TTTGGGATCATTTGCCCTGTGAGGGGACTGACCACCACTCCTCCCCCTCTCCACCCACAGC					
AAACCCTAGTAACGGGACACTCCCTGACTGGTGGTGAGGAGGGGAGAGGGTGGGGTCG					
790	800				
CCCCTCACTCTGGGCGCCCTCAG					
GGGGAGTGAGACCCGCGGGAGTC					

[I-2] A találmány szerinti eljárással előállított DNS-ek humán tumor nekrozis faktornak (humán TNF), vagy annak fő része(i)nek, vagy allél mutáns polipeptidjének megfelelő bázisszekvenciájúak, vagy ilyen bázisszekvenciát tartalmaznak, vagy a fenti bázisszekvencia módosításával nyerhetők. Közelebbről, a találmány szerinti eljárással előállított DNS-ek az (I) általános képletű aminosavszekvenciának

(Y)_p-(X)_n-(B)_m-A (I)

megfelelő bázisszekvenciájúak,

vagy olyan bázisszekvenciát tartalmaznak, amelyben egy fenti bázisszekvencia 3'-végéhez egy terminációs kodon kapcsolódik. Az (I) általános képletben

A jelentése (Ia) képletű polipeptid, amelyből egy vagy több aminosav hiányozhat, vagy amelyben egy vagy több aminosav más aminosavval lehet helyettesítve, de a homológia mértéke legalább 95%;

5 B jelentése (Ib) képletű peptid, amelyből 1-3 aminosav hiányozhat,

X jelentése az érett TNF-ben nem szereplő, teljes vagy részleges prekursor szekvencia

Y jelentése Met és

10 m, n és p értéke 1 vagy 0.

Az (Ia) képletű polipeptid aminosavszekvenciája az alábbi:

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

Az (Ib) képletű peptid aminosavszekvenciája a következő:

Ser -Ser -Ser -Arg

(Ib)

Az (I) általános képletben X előnyösen egy (Ic) képletű polipeptidet jelent.

Ser	Thr	Glu	Ser	Met	Ile	Arg	Asp	Val	Glu	
Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Leu	Pro	Lys	Lys	Thr	
Gly	Gly	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Cys	Leu	
Phe	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	(Ic)
Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Phe	Cys	Leu	Leu	
His	Phe	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Gln	Arg	Glu	
Glu	Phe	Pro	Arg	Asp	Leu	Ser	Leu	Ile	Ser	
Pro	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg				

A fenti (Ia), (Ib) és (Ic) képletű aminosav-szekvenciáknak az alábbi (IIa), (IIb) és (IIc) képletű bázisszekvenciák felelnek meg.

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

GAG	ATC	AAT	CGG	CCC	GAC	TAT	CTC	GAC	TTT
GCC	GAG	TCT	GGG	CAG	GTC	TAC	TTT	GGG	ATC
ATT	GCC	CTG-(3')							
(5') - TCA - CT - TCT - CGA - (3')									
(5')-	AGC	ACT	GAA	AGC	ATG	ATC	CGG	GAC	
GTG	GAG	CTG	GCC	GAG	GAG	GCG	CTC	CCC	AAG
AAG	ACA	GGG	GGG	CCC	CAG	GGC	TCC	AGG	CGG
TGC	TTG	TTC	CTC	AGC	CTC	TTC	TCC	TTC	CTG
ATC	GTG	GCA	GGC	GCC	ACC	ACG	CTC	TTC	TGC
CTG	CTG	CAC	TTT	GGA	GTG	ATC	GGC	CCC	CAG
AGG	GAA	GAG	TTC	CCC	AGG	GAC	CTC	TCT	CTA
ATC	AGC	CCT	CTG	GCC	CAG	GCA	GTA	AGA-(3')	

(Iib)

(Iic)

A találmány szerinti eljárással az alábbi DNS-ek állíthatók elő:

- 1) humán TNF polipeptidet, vagy annak fő részét vagy részeit kódoló DNS-ek,
- 2) humán TNF polipeptidet vagy annak fő része(i)t kódoló DNS allél mutáns DNS-ei,
- 3) humán TNF polipeptidet vagy annak allél mutáns polipeptidjét kódoló DNS módosításával nyert DNS-ek,
- 4) humán TNF polipeptidet vagy annak allél mutáns polipeptidjét kódoló DNS-ek kémiai vagy enzimatikus módosításával nyert DNS-ek,
- 5) humán TNF polipeptid vagy annak fő része(i) aktivitásával lényegében azonos aktivitású polipeptidet kódoló DNS-ek,
- 6) humán TNF polipeptidet vagy annak fő része(i)t kódoló degeneratív DNS-ek,
- 7) humán TNF polipeptidet kódoló olyan DNS-ek, amelyekből egy vagy több kodon hiányzik, vagy más kodon(ok)kal van helyettesítve,
- 8) humán TNF polipeptidet vagy annak fő része(i)t kódoló DNS-ek, amelyekben iniciációs kodon és/vagy terminációs kodon és/vagy egy, az iniciációs kodonnal ellentett irányban Shine-Dalgarno szekvenciával folytatódó promotor van.
- 9) olyan DNS-ek, amelyek bázisszekvenciája különbözik ugyan a nyúl TNF-et kódoló bázisszekvenciától, de a fenti bázisszekvencia egy részével vagy részével erősen homológ.

4. táblázat

GACCCACGG			
-30	-20	-10	-1
CTCCACCTC	TCTCCCCTGG	AAAGGACACC	
1	10	20	30
ATGAGCACTG	AAAGCATGAT	CCGGGACGTG	
Met Ser Thr Glu Ser Met Ile Arg Asp Val			
40	50	60	
GAGCTGGCCG	AGGAGGCGCT	CCCCAAGAAG	
Glu Leu Ala Glu Glu Ala Leu Pro Lys Lys			
70	80	90	
ACAGGGGGGC	CCCAGGGGCTC	CAGGCGGTGC	
Thr Gly Gly Pro Gln Gly Ser Arg Arg Cys			
100	110	120	
TTGTTCTCTCA	GCCTCTTCTC	CTTCCTGATC	
Leu Phe Leu Ser Leu Phe Ser Phe Leu Ile			
130	140	150	
GTGGCAGGCG	CCACCACGCT	CTTCTGCCTG	
Val Ala Gly Ala Thr Thr Leu Phe Cys Leu			

A találmány szerinti eljárással előállított DNS-ek közül előnyösek az alábbiak:

- 1) az olyan bázisszekvenciájú DNS, amely olyan (I) általános képletű aminosavszekvenciának felel meg, ahol A jelentése (Ia), B jelentése (Ib), X jelentése (Ic), m és n értéke 1, és Y és p jelentése az (I) általános képletre fent megadott,
 - 2) az olyan bázisszekvenciájú DNS, amely olyan (I) általános képletű aminosavszekvenciának felel meg, ahol A jelentése (Ia), B jelentése (Ib), m értéke 1, n értéke 0, és Y és p jelentése a fenti,
 - 25 3) az olyan bázisszekvenciájú DNS, amely olyan (I) általános képletű aminosavszekvenciának felel meg, ahol A jelentése (Ia), m és n értéke 0, és Y és p az (I) képletre megadott jelentésű.
- Különösen előnyös az olyan bázisszekvenciájú DNS, amely olyan (I) általános képletű aminosavszekvenciának felel meg, ahol A jelentése (Ia), B jelentése (Ib), m értéke 1 vagy 0, és n és p értéke 0.
- Az a bázisszekvencia, amely olyan (I) általános képletű aminosavszekvenciának felel meg, ahol A jelentése (Ia), B jelentése (Ib), X jelentése (Ic), és m, n és p értéke 1, a 4. táblázatban megadott bázisszekvencia 1-699. számú bázisaiból álló fragmenssel azonos. Az (Ia) képletű aminosavszekvenciának megfelelő bázisszekvencia a 4. táblázat 247-699. számú bázisaiból álló fragmenssel azonos, és a fenti bázis-szekvenciának megfelelő aminosavszekvenciában az aminosavak

```

      160      170      180
CTGCACTTTG GAGTGATCGG CCCCCAGAGG
LeuHisPheGlyValIleGlyProGlnArg
      190      200      210
GAAGAGTTCC CCAGGGACCT CTCTCTAATC
GluGluPheProArgAspLeuSerLeuIle
      220      230      240
AGCCCTCTGG CCCAGGCAGT CAGATCATCT
SerProLeuAlaGlnAlaValArgSerSer
      250      260      270
TCTCGAACCCCGAGTGACAA GCCTGTAGCC
SerArgThrProSerAspLysProValAla
      280      290      300
CATGTTGTAG CAAACCCTCA AGCTGAGGGG
HisValValAlaAsnProGlnAlaGluGly
      310      320      330
CAGCTCCAGT GGCTGAACCG CCGGGCCAAT
GlnLeuGlnTrpLeuAsnArgArgAlaAsn
      340      350      360
GCCCTCCTGG CCAATGGCGT GGAGCTGAGA
AlaLeuLeuAlaAsnGlyValGluLeuArg
      370      380      390
GATAACCAGC TGGTGGTGCC ATCAGAGGGC
AspAsnGlnLeuValValProSerGluGly
      400      410      420
CTGTACCTCA TCTACTCCCA GGTCCTCTTC
LeuTryLeuIleTyrSerGlnValLeuPhe
      430      440      450
AAGGGCCAAG GCTGCCCCTC CACCCATGTG
LysGlyGlnGlyCysProSerThrHisVal
      460      470      480
CTCCTCACCC ACACCATCAG CCGCATCGCC
LeuLeuThrHisThrIleSerArgIleAla
      490      500      510
GTCTCCTACC AGACCAAGGT CAACCTCCTC
ValSerTyrGlnThrLysValAsnLeuLeu
      520      530      540
TCTGCCATCA AGAGCCCCTG CCAGAGGGAG
SerAlaIleLysSerProCysGlnArgGlu
      550      560      570
ACCCAGAGGGGGCTGAGGC CAAGCCCTGG
ThrProGluGlyAlaGluAlaLysProTrp
      580      590      600
TATGAGCCCA TCTATCTGGG AGGGGTCTTC
TyrGluProIleTyrLeuGlyGlyValPhe
      610      620      630
CAGCTGGAGAAGGGTGACCG ACTCAGCGCT
GlnLeuGluLysGlyAspArgLeuSerAla
      640      650      660
GAGATCAATC GGCCCGACTA TCTCGACTTT
GluIleAsnArgProAspTyrLeuAspPhe
      670      680      690
GCCGAGTCTG GGCAGGTCTA CTTTGGGATC
AlaGluSerGlyGlnValTyrPheGlyIle
      700      710      720
ATTGCCCTGTGAGGAGGACG AACATCCAAC
IleAlaLeu
      730      740
CTTCCCAAACGCCTCCCCTGC

```

száma összesen 151.

A 4. táblázatban a felső sorok a bázisszekvenciát, az alsó sorok a megfelelő aminosavszekvenciát jelenítik.

Az olyan (Ia) képletű polipeptid példaként, ahol egy vagy több aminosav hiányzik, vagy más aminosavval van helyettesítve, az alábbiakat említjük meg:

- 4) olyan (Ia) képletű polipeptid, amelynek az N-terminális végen 1. helyzetben lévő Thr aminosavja hiányzik,
- 5) olyan (Ia) képletű polipeptid, amelyből az 1. helyzetű Thr-tól a 6. helyzetű Pro-ig terjedő aminosavszekvencia hiányzik az N-terminális végen,
- 6) olyan (Ia) képletű polipeptid, amelynek N-terminális végéről az 1. helyzetű Thr-tól a 9. helyzetű His-ig terjedő aminosavszekvencia hiányzik.

7) olyan (Ia) képletű polipeptid, amelynek N-terminális végéről az 1. helyzetű Thr-tól 12. helyzetű Ala-ig terjedő aminosavszekvencia hiányzik, és

8) olyan (Ia) képletű polipeptid, amelyben az N-terminálisról számított 66. helyzetben lévő Thr His-sel, és a 67. helyzetben lévő His Thr-nal vagy Tyr-nak van helyettesítve.

Véleményünk szerint biológiai aktivitással rendelkező polipeptid kódolására a DNS-nek fontos része

9) az 5. táblázat felső sorában feltüntetett bázisszekvenciából legalább az 577-708. számú bázisokból álló fragmens, és még pontosabban

10) az 5. táblázat felső sorában feltüntetett bázisszekvenciából legalább a 658-708. számú bázisokból álló fragmens.

5. táblázat

ATGAGCACTGAAAGCATGATCCGGGACGTG	30
ATGAGCACTGAGAGTATGATCCGGGACGTC	
GAGCTGGCCGAGGAGGCGCTCCCCAAGAAG	60
GAGCTGGCGGAGGGGCGCTCCCCAAGAAG	
ACAGGGGGGGCCCCAGGGCTCCAGGCGGTGC	90
GCAGGGGGGGCCCCAGGGCTCCAAGCGCTGC	
TTGTTCCTCAGCCTCTTCTCTTCCTGATC	120
CTCTGCCTCAGCCTCTTCTCTTTCCTGCTC	
GTGGCAGGCGCCACCACGCTCTTCTGCCTG	150
GTGGCTGGAGCCACCACGCTCTTCTGCCTG	
CTGCACTTTGGAAGTGATCGGCCCCAGAGG	180
CTGCACTTCAGGGTGATCGGCCCTCAGGAG	
GAAGAG--TTCCCCAGGGACCTCTCTCTA	210
GAAGAGCAGTCCCCAACAACTCTCTCTA	
ATCAGCCCTCTGGCCAG-----GCAGTC	240
GTCAACCCTGTGGCCAGATGGTCACTCTC	
AGATCATCTTCTCGAACCCCGAGTGACAAG	270
AGATCAGCTTCTCGGGCCCTGAGTGACAAG	
CCTGTAGCCCATGTGTAGCAAACCCCTCAA	300
CCTCTAGCCCACTGTGTAGCAAACCCGCAA	
GCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAAACCGC	330
GTGGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAGCCAG	

Felső sorok: humán TNF prekursor kódoló bázisszekvencia

Alsó sorok: nyúl TNF prekursor kódoló bázisszekvencia

```

360
CGGGCCCAATGCCCTCCTGGCCAATGGCGTGT
CGTGCGAACGCCCTGCTGGCCAAACGGCATG
390
GAGCTGAGAGGATAACCAGCTGGTGGTGCCA
AAGCTCACGGAACAACCAGCTGGTGGTGCCG
420
TCAGAGGGGCCTGTACCTCATCTACTCCCAG
GCCGACGGGCTGTACCTCATCTACTCCCAG
450
GTCTCTTCAAGGGCCAAGGCTGCCOCTCC
GTTCTCTTCAAGCGGTCAAGGCTGCCGCTCC
480
ACCCATGTGCTCCTCACCCACACCATCAGC
--TACGTGCTCCTCACTCACACTGTCAGC
510
CGCATCGCCGTCTCCTACCAAGACCAAGGTC
CGCTTCGCCGTCTCCTACCCGAACAAGGTC
540
AACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGC
AACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGC
570
CAGAGGGGAGACCCCAAGAGGGGCTGAGGCC
CACCGGGGAGACCCCGAGGAGGCTGAGGCC
600
AAGCCCTGGTATGAGCCCATCTATCTGGGA
ATGGCCTGGTACGAGCCCATCTACTGGGC
630
GGGGTCTTCCAGCTGGAGAAGGGTGACCGA
GGCGTCTTCCAGTTGGAGAAGGGTGACCGG
660
CTCAGCGCTGAGATCAATCGGCCCGACTAT
CTCAGCAACGAGGTCAACCAAGCCTGAGTAC
690
CTCGACTTTGCCGAGTCTGGGCAGGTCTAC
CTGGACCTTGCCGAGTCCGGGCAGGTCTAC
***
TTTGGGATCATTGCCCTGTGA
TTTGGGATCATTGCCCTGTGA

```

A bekeretezett részek homológ szakaszokat jelentenek

--- jelentése: egy kodon hiányzik

*** jelentése: terminációs kodon

45

[I-3] A találmány értelmében a DNS-eket az alábbi eljárások szerint állíthatjuk elő.

A humán TNF polipeptidet, vagy annak fő részét kódoló DNS-t úgy állítjuk elő, hogy humán makrofágokat indukálószer(ek)kel együtt tenyésztünk, a humán TNF mRNS-t tartalmazó frakciót elválasztjuk az indukált sejtekből, a frakcióból egy cDNS-t állítunk elő, és a humán TNF cDNS-t differenciál hibridizációs módszerrel klónozzuk, mintaként megfelelő DNS-t – például nyúl TNF cDNS-fragmenst – használva, vagy differenciál hibridizációs módszert használunk, mRNS hibridizáció-transzlációs vizsgálattal kiegészítve.

A DNS-t tehát az alábbi lépésekkel állíthatjuk elő:

A) humán makrofágokat indukálószer(ek)kel együtt tenyésztünk,

B) a humán TNF mRNS-t tartalmazó frakciót elválasztjuk az indukált sejtekből,

C) a mRNS-ből reverz transzkriptázzal sscDNS-t állítunk elő, majd azt dscDNS-sé alakítjuk,

50 D) a dscDNS-t egy vektorba illesztjük,

E) a rekombináns vektort egy gazdaszervezetbe juttatva a gazdaszervezetet oly módon transzformáljuk, hogy az egy cDNS génállományt képezzen,

F) kiválasztjuk a hTNF-et kódoló klónokat, és

55 G) a humán TNF polipeptidet vagy annak fő részét kódoló cDNS-t a fenti génállományból klónozzuk.

A DNS előállítását részletesen az alábbiakban ismertetjük, a korlátozás szándéka nélkül.

60

(1) Humán TNF mRNS előállítása

A humán TNF mRNS-t humán makrofágokból állíthatjuk elő, például az alábbiak szerint.

A humán makrofágokat például humán alveoluszából nyerhetjük, Sone és munkatársai [J. Immunol. 129, 1313 (1982)] módszerével, vagy vérből, Matthews [Br. J. Cancer, 48, 405 (1983)] módszere, szerint vagy placentából, Wilson és munkatársai [J. Immunological Methods, 56, 305 (1983)] módszerével, vagy egyéb szövetekből.

A kapott makrofágokat egy csészébe oltjuk le, $2 \cdot 10^4$ – $1 \cdot 10^6$ sejt/cm² sejtsűrűséget biztosítva, majd 35–38 °C-on, előnyösen 37 °C körüli hőmérsékleten 5% szén-dioxidot tartalmazó, telített páratartalmú légterben 30 perc – 2 órán át előtenyésztjük.

Ezután indukálószerként egy Gram-negatív baktériumból kapott endotoxint – előnyösen *Escherichia coli*-ből, *Pseudomonas aeruginosa*-ból vagy *Salmonella typhi*-ből származó lipopoliszacharidot –, és proteinszintézis-inhibitorként cikloheximidet adunk a sejtekhez. A tenyésztést 3–8 órán át tovább folytatjuk, hogy a makrofágokban felhalmozódjon a humán TNF mRNS. Az előtenyésztést el is hagyhatjuk. Az endotoxin mennyisége általában 0,1–1000 mikrogramm/ml, előnyösen 1–100 mikrogramm/ml. Ekkor indukálószerként egy forbol-észtert – például forbol-12-mirisztát-13-acetátot, forbol-12,13-didekanoátot vagy forbol-12,13-dibenzoátot – is adhatunk a rendszerhez 1–2000 ng/ml koncentrációban. A proteinszintézis-inhibitor mennyisége annak típusától függően változik. Cikloheximidből például 0,1–50 mikrogramm/ml mennyiséget használunk. Tápközegeként emlős sejtek tenyésztésére alkalmas különféle táptalajokat használhatunk, például RPMI-1640 táptalajt, Eagleféle minimáltáptalajt (MEM), vagy Dulbecco-féle módosított minimáltáptalajt [a fenti táptalajok összetételét például a „Cell Cultivation Manual”, szerkesztő Y. Sohma, Kodansha (1982), vagy J. Paul: „Cell and Tissue Culture”. E. and A. Livingstone Ltd. (1970) irodalmi helyeken találhatjuk meg]. A tápközeghez előnyösen állati szérumot – például magzati marhaszérumot vagy borjúszérumot – is adunk, 1–20% mennyiségben.

A tenyésztési szakasz befejeztével, az RNS-t a szokásos módszerekkel – például Chirgwin és munkatársai [Biochemistry, 18, 5294 (1979)] módszerével – extraháljuk a sejtekből, majd oligo(dT9)-cellulózra vagy poli(U)-Sephareose-on affinitási oszlopkromatográfiás eljárással, vagy szakaszos módszerrel elválasztjuk a poli(A)mRNS-t tartalmazó frakciót. A poli(A)mRNS-t tartalmazó frakciót sav-karbamid agaróz gélelektroforézisnek, vagy szacharóz sűrűséggradiens centrifugálásnak alávetve humán TNF mRNS-ben feloldult mRNS-frakciót nyerhetünk.

Annak megerősítésére, hogy a kapott mRNS-frakció valóban a humán TNF polipeptidet kódoló mRNS-t tartalmazza, a mRNS-sel fehérjét szintetizáltunk, és a kapott fehérje biológiai aktivitását megvizsgáltuk. Ezt a vizsgálatot például úgy végezhetjük el, hogy a mRNS-t *Xenopus laevis* oocitájába injektáljuk, vagy megfelelő protein-szintetizáló rendszerhez – például

retikulocita-lizátumhoz vagy búzacíra sejtmentes protein-szintetizáló rendszerhez – adjuk, és kimutatjuk, hogy a transzláció révén keletkezett protein egér L-sejtekkel szemben in vitro citotoxikus hatást fejt ki.

(2) Humán TNF cDNS klónozása

A fenti (1) lépés szerint kapott poli(A)mRNS-frakciót vagy a feldúsított mRNS-frakciót használjuk templátként, és primerként egy oligo(dT)-t használunk sscDNS előállítására, reverz transzkriptáz – például madár mieloblasztózis vírusból származó reverz transzkriptáz (AMV) – segítségével, dATP, dGTP, dCTP és dTTP jelenlétében. Ezután az sscDNS-t templátként használva dscDNS-t szintetizálunk, reverz transzkriptáz vagy *E. coli* DNS-polimeráz I (nagy fragmens) segítségével.

A kapott dscDNS-t például a pBR322 plazmidba illesztjük, a restriktációs endonukleáz Pst I hasítási helyén, a szokásos módon, például poli(dG)-poli(dC) homopolimer extenziós módszerrel [T.S. Nelson: Methods in Enzymology, 68, 41 (1979), Academic Press Inc., New York]. A kapott rekombináns plazmidokat ezután egy gazdasejtbe – például *E. coli* 1776-ba – juttatjuk Cohen és munkatársai [Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)] módszere szerint, transzformálás céljából, majd a tetraciklin-rezisztens telepek kiválasztásával egy cDNS (telep) génállományt készítünk.

A cDNS génállományt ezután telep-hibridizációnak vetjük alá [D. Hanahan és munkatársai: Gene, 10, 63 (1980)], mintaként az 1. referenciapélda szerint előállított ³²P-jelzett nyúl TNF cDNS fragmenset használva, és a kívánt, humán TNF polipeptidet kódoló beillesztett cDNS-t tartalmazó rekombináns plazmidokat befogadó klónokra szűrővizsgálatot végzünk.

Ha a fenti módon nem kapunk megfelelő TNF cDNS-mintát, a kívánt klónokra telep-hibridizációs szűrővizsgálatot végzünk, pozitív és negatív indukciós mintákat használva, és hibridizációs transzlációs vizsgálatot, az alábbiak szerint.

Az (1) lépés szerint előállított, humán TNF mRNS-t tartalmazó poli(A)mRNS-frakciót vagy dúsított mRNS-frakciót templátként használva ³²P-jelzett cDNS-t szintetizálunk, és pozitív indukciós mintaként használjuk. Egy másik mRNS-frakciót – melyet szintén a fentiek szerint állítottunk elő, azzal az eltéréssel, hogy nem indukált makrofágokat használtunk kiindulási anyagként – templátként használva ³²P-jelzett cDNS-t szintetizálunk, melyet negatív indukciós mintaként használunk. A fenti módon kapott cDNS génállományból kiválasztjuk azokat a plazmid-klónokat, amelyek a pozitív indukciós mintával erősen hibridizálódnak, de a negatív indukciós mintával nem hibridizálódnak.

Annak megerősítésére, hogy a kapott klónok valóban befogadták a humán TNF polipeptidet kódoló beillesztett cDNS-t, a következő vizsgálatot végezzük el. A fenti klónokból izoláljuk a plazmid DNS-eket, melegítéssel vagy lúgos kezeléssel egyszálú DNS-sé alakítjuk, és nitrocellulóz szűrőre visszük. A humán

TNF mRNS-t tartalmazó mRNS-frakciót hozzáadjuk a szűrőn lévő DNS-hez, hibridizálás céljából. Ezután a hibridizált mRNS-t eluáljuk és visszanyerjük. A visszanyert mRNS-t *Xenopus laevis* oocitáiba injektálva megállapítjuk, hogy a visszanyert mRNS valóban humán TNF polipeptidet kódol-e.

A fenti módszerekkel olyan transzformált DNS-ekhez jutunk, amelyek a humán TNF mRNS bázisszekvenciájával komplementer DNS-fragmenset tartalmazó rekombináns plazmidot fogadtak be.

Ha a kapott klónozott cDNS-ek nem tartalmazzák a humán TNF polipeptid kódolásához szükséges teljes molekulaszakaszt, nagyobb méretű cDNS-eket úgy választunk ki a cDNS génállományból, hogy mintaként a transzformált DNS-ekből szelektált klónozott TNF cDNS-fragmenseket használjuk.

A humán TNF polipeptid aminosavszekvenciáját tartalmazó polipeptidet kódoló klónozott cDNS-t végül úgy is előállíthatjuk, hogy a kapott klónozott cDNS-fragmensek bázisszekvenciáját például Maxam-Gilbert módszerrel [Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 74, 560 (1977)] meghatározzuk, megkeressük a nyúl TNF cDNS bázisszekvenciájával homológ bázisszekvenciákat, és kiválasztjuk azokat a cDNS-eket, amelyek a humán TNF polipeptid teljes kódoló régiójának megfelelő bázisszekvenciát tartalmazzák.

A nyúl TNF-et és a humán TNF polipeptidet kódoló bázisszekvenciák közötti homológiát, valamint az ebből következtetett, nyúl TNF és humán TNF polipeptid aminosavszekvenciák közötti homológiát az 5. és 6. táblázatban mutatjuk be.

6. táblázat

										10
Met	Ser	Thr	Glu	Ser	Met	Ile	Arg	Asp	Val	
Met	Ser	Thr	Glu	Ser	Met	Ile	Arg	Asp	Val	
										20
Glu	Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Leu	Pro	Lys	Lys	
Glu	Leu	Ala	Glu	Gly	Pro	Leu	Pro	Lys	Lys	
										30
Thr	Gly	Gly	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Cys	
Ala	Gly	Gly	Pro	Gln	Gyl	Ser	Lys	Arg	Cys	
										40
Leu	Phe	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Leu	Ile	
Leu	Cys	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Leu	Ieu	
										50
Val	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Phe	Cys	Leu	
Val	Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Phe	Cys	Leu	
										60
Leu	His	Phe	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Gln	Arg	
Leu	His	Phe	Arg	Val	Ile	Gly	Pro	Gln	Glu	
										70
Glu	Glu	---	Phe	Pro	Arg	Asp	Leu	Ser	Leu	
Glu	Glu	Gln	Ser	Pro	Asn	Asn	Leu	His	Leu	
										80
Ile	Ser	Pro	Leu	Ala	Gln	---	---	Ala	Val	
Val	Asn	Pro	Val	Ala	Gln	Met	Val	Thr	Leu	
										90
Arg	Ser	Ser	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Asp	Lys	
Arg	Ser	Ala	Ser	Arg	Ala	Leu	Ser	Asp	Lys	
										100
Pro	Val	Ala	His	Val	Val	Ala	Asn	Pro	Gln	
Pro	Leu	Ala	His	Val	Val	Ala	Asn	Pro	Gln	
										110
Ala	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Asn	Arg	
Val	Glu	Gly	Gln	Leu	Gln	Trp	Leu	Ser	Gln	
										120
Arg	Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Val	
Arg	Ala	Asn	Ala	Leu	Leu	Ala	Asn	Gly	Met	

Felső sorok: humán TNF prekursor

Alsó sorok: nyúl TNF prekursor

6. táblázat (folytatás)

130											
Glu	Leu	Arg	Asp	Asn	Gln	Leu	Val	Val	Pro		
Lys	Leu	Thr	Asp	Asn	Gln	Leu	Val	Val	Pro		
140											
Ser	Glu		Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	
Ala	Asp		Gly	Leu	Tyr	Leu	Ile	Tyr	Ser	Gln	
150											
Val	Leu	Phe	Lys	Gly	Gln	Gly	Cys	Pro	Ser		
Val	Leu	Phe	Ser	Gly	Gln	Gly	Cys	Arg	Ser		
160											
Thr	His		Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Ile	Ser	
---	Tyr		Val	Leu	Leu	Thr	His	Thr	Val	Ser	
170											
Arg	Ile		Ala	Val	Ser	Tyr	Gln	Thr	Lys	Val	
Arg	Phe		Ala	Val	Ser	Tyr	Pro	Asn	Lys	Val	
180											
Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Pro	Cys		
Asn	Leu	Leu	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Pro	Cys		
190											
Gln	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Gly	Ala	Glu	Ala		
His	Arg	Glu	Thr	Pro	Glu	Glu	Ala	Glu	Pro		
200											
Lys	Pro		Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	
Met	Ala		Trp	Tyr	Glu	Pro	Ile	Tyr	Leu	Gly	
210											
Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Asp	Arg		
Gly	Val	Phe	Gln	Leu	Glu	Lys	Gly	Asp	Arg		
220											
Leu	Ser	Ala	Glu	Ile	Asn	Arg	Pro	Asp	Tyr		
Leu	Ser	Thr	Glu	Val	Asn	Gln	Pro	Glu	Tyr		
230											
Leu	Asp	Phe	Ala	Glu	Ser	Gly	Gln	Val	Tyr		
Leu	Asp	Leu	Ala	Glu	Ser	Gly	Gln	Val	Tyr		
Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu						
Phe	Gly	Ile	Ile	Ala	Leu						

A bekeretezett részek homológ szakaszokat jelentenek
 --- jelentése: egy aminosav hiányzik

A fenti homológiákat és a nyúl plazma TNF meghatározott N-terminális és C-terminális aminosavszekvenciáit (3. referenciapélda) figyelembe véve megállapítható, hogy a humán TNF cDNS a humán TNF 233 aminosavból álló prekursor polipeptidjét kódolja, és a biológiailag aktív humán TNF polipeptid olyan polipeptid, amely prekursorának C-terminális végétől számított 155 aminosavból álló szekvenciának felel meg.

A biológiailag aktív humán TNF polipeptidet olyan bázisszekvencia kódolja, amely olyan (I) általános képletű polipeptidnek felel meg, ahol A jelentése (Ia) képletű aminosavszekvencia, B jelentése (Ib) képletű aminosavszekvencia, és m értéke 1, n és p értéke 0.

A humán TNF prekursor polipeptidet olyan bázisszekvencia kódolja, amely olyan (I) általános képletű polipeptidnek felel meg, ahol A jelentése (Ia) képletű aminosavszekvencia, B jelentése (Ib) képletű aminosavszekvencia, X jelentése (Ic) képletű aminosavszekvencia, m, n és p értéke 1, és Y jelentése Met.

A bázisszekvenciában és aminosavszekvenciában megfigyelhető nagy mértékű homológia arra utal, hogy a humán és nyúl TNF-ek filogenetikusan ugyanabból a génből származnak, és arra enged következtetni, hogy a közös régiók jelentős része(i) olyan szekvenciát jelentenek, amely a biológiai hatás kifejeződéséhez szükséges. Azonban a biológiailag aktív humán TNF polipeptid immunológiailag nem ad keresztreakciót a nyúl plazma TNF-fel, mint az alább látható. Valószínűleg a biológiailag aktív humán TNF polipeptid teljes aminosavszekvenciája nem minden esetben szükséges a hatás megmutatkozásához, és egy részben módosított humán TNF polipeptid is hatásos lehet abban az esetben, ha a biológiailag aktív TNF polipeptid aktív helyeit tartalmazza.

[II-1] A találmány humán tumor nekrozis faktor polipeptid, vagy egy azt tartalmazó polipeptid, vagy annak fő része(i), vagy humán tumor nekrozis faktorhoz hasonló anyag, és annak fő része(i) előállítására is vo-

natkozik. A fenti vegyületek közelebbről az (I) általános képlettel

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A$ (I)
jellemezhetők, vagy annak származékai vagy sói. A fenti képletben

5

A jelentése (Ia) képletű polipeptid, amelyből egy vagy több aminosav hiányozhat, vagy más aminosav(ak)kal lehet helyettesítve, de a homológia mértéke legalább 95%;

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

B jelentése
Ser-Ser-Ser-Arg (Ib)

képletű peptid, amelyből 1-3 aminosav hiányozhat, vagy más aminosav(ak)kal lehet helyettesítve,

25 X jelentése az érett TNF-ben nem szereplő, teljes vagy részleges prekursor szekvencia
Y jelentése Met és
m, n, és p értéke 1 vagy 0.

Előnyösek azok az (I) általános képletű polipeptidek, amelyek képletében X jelentése (Ic) képletű polipeptid:

Ser	Thr	Gly	Ser	Met	Ile	Arg	Asp	Val	Glu	
Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Leu	Pro	Lys	Lys	Thr	
Gly	Gly	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Cys	Leu	(Ic)
Phe	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	
Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Phe	Cys	Leu	Leu	
His	Phe	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Gln	Arg	Glu	
Glu	Phe	Pro	Arg	Asp	Leu	Ser	Leu	Ile	Ser	
Pro	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg				

A találmány szerinti eljárással tehát az alábbi polipeptidek állíthatók elő:

- 1) egy, a fenti [I] fejezetben ismertetett DNS-nek megfelelő polipeptid, amelyet egy olyan expressziós vektorral transzformált gazdaszervezetben állítunk elő, amelybe egy fenti DNS-t illesztettünk be;
- 2) humán TNF polipeptid, vagy annak polipeptid prekursora;
- 3) olyan humán TNF polipeptid, amelyből egy vagy több aminosav hiányzik, vagy más aminosav(ak)kal van helyettesítve; de a homológia mértéke legalább 95%;
- 4) olyan polipeptid, amely a humán TNF polipeptid lényeges részét tartalmazza;
- 5) olyan, a nyúl TNF polipeptidtól eltérő polipeptid, amely a nyúl TNF polipeptid egy részével vagy részeivel nagy homológiát mutató polipeptidből áll, vagy ilyen polipeptidet tartalmaz;

- 6) humán TNF polipeptid dagradációs terméke, amely a gazdaszervezetben keletkezett;
- 7) humán TNF polipeptid kémiai vagy enzimatisz módosításával nyert polipeptid, vagy annak származékai; és
- 8) a humán TNF polipeptid biológiai aktivitásával lényegében ekvivalens aktivitással rendelkező, vagy potenciálisan rendelkező polipeptidek.

50

A találmány szerinti eljárással előnyösen az alábbi polipeptidek állíthatók elő:

- 1) az olyan (I) általános képletű polipeptidek, amelyek képletében A jelentése (Ia), B jelentése (Ib), m értéke 1, n értéke 0, és Y és p jelentése az (I) általános képletre megadott;
- 2) az olyan (I) általános képletű polipeptidek, amelyek képletében A jelentése (Ia), m és n értéke 0, Y és p jelentése az (I) általános képletre megadott;

60

3) az olyan (I) általános képletű polipeptidek, amelyek képletében A jelentése (Ia), B jelentése (Ib), X jelentése (Ic), m és n értéke 1, Y és p jelentése az (I) általános képletre megadott.

Különösen előnyös az a polipeptid, amelynek (I) általános képletében A jelentése (Ia), B jelentése (Ib), m értéke 1 vagy 0, és n és p értéke 0, vagy gyógyászatiilag elfogadható sói.

Az (Ia) képletű polipeptidnek a 6. táblázat alsó sorában feltüntetett aminosavszekvencia 86–236. aminosavakból álló szakasza felel meg.

Az olyan (Ia) általános képletű polipeptidekre példaként, amelyekből egy vagy több aminosav hiányzik, vagy egy más aminosavra van cserélve, az alábbiakat említjük:

- 4) olyan (Ia) képletű polipeptid, amelyből az N-terminálshoz képest 1. helyzetben lévő Thr hiányzik;
- 5) olyan (Ia) képletű polipeptid, amelyből az N-terminálshoz képest 1. helyzetben lévő Thr-tól a 6. helyzetben lévő Pro-ig tartó aminosavszekvencia hiányzik;
- 6) olyan (Ia) képletű polipeptid, amelyből az N-terminálshoz képest 1. helyzetben lévő Thr-tól a 9-es helyzetben lévő His-ig tartó aminosavszekvencia hiányzik;
- 7) olyan (Ia) képletű polipeptid, amelyből az N-terminálshoz képest 1. helyzetben lévő Thr-tól a 12. helyzetben lévő Ala-ig tartó aminosavszekvencia hiányzik; és
- 8) olyan (Ia) képletű polipeptid, amelyben az N-terminálshoz képest 66. helyzetben lévő Thr His-re, a 67. helyzetben lévő His Thr-ra vagy Tyr-ra van cserélve.

Véleményünk szerint a biológiai aktivitás szempontjából a polipeptid aminosavszekvenciájából fontos 9) a 6. táblázat alsó sorában a 193. helyzetű Trp-tól a 236. helyzetű Leu-ig tartó aminosavszekvencia, és közelebbről

10) a 6. táblázat alsó sorában a 220. helyzetű Tyr-tól a 236. helyzetben lévő Leu-ig tartó aminosavszekvencia.

Az (I) általános képletű polipeptidek aggregátumok formájában, például trimerként is létezhetnek, a fenti aggregátumok természetesen szintén a találmány tárgykörébe tartoznak.

A találmány értelmében az (I) általános képletű humán TNF polipeptidet az alábbiak szerint állítjuk elő:

- A) az (I) általános képletű humán TNF polipeptidet kódoló bázisszekvenciájú DNS-t kívánt esetben egy heterológ polipeptidet kódoló DNS-sel összekapcsolunk, egy expressziós vektorba illesztjük;
- B) a rekombináns vektort bevisszük egy gazdaszervezetbe;
- C) a rekombináns vektorral transzformált gazdaszervezetet tenyésztve előállítjuk a polipeptidet;
- D) a tenyésztett sejteket összegyűjtjük és a termelt polipeptidet a sejtekből extraháljuk; és
- E) a polipeptidet a proteinek tisztítására szokásosan alkalmazott eljárásokkal tisztítjuk.

(1) Humán TNF polipeptid előállítása

A találmány szerinti eljárással előállított DNS segítségével az alábbiak szerint állítjuk elő a humán TNF polipeptidet.

5 A humán TNF polipeptid előállításához szükséges expressziós vektort úgy nyerhetjük, hogy a humán TNF polipeptidet kódoló DNS-t megfelelő vektorba illesztjük. Minden olyan vektor megfelel a fenti célra, amely a transzformálandó mikroorganizmusban proliferál. Példaként a plazmidokat – például E. coli pBR322 plazmid –, fágokat – például fág-származékok –, és a vírusokat – például az SV40 vírust – említjük. A fenti vektorokat külön-külön, vagy kombinációban alkalmazhatjuk, például pBR322-SV40 hibrid plazmidként. A DNS beillesztésének helyét célszerűen megválaszthatjuk. Más szóval, a megfelelő vektort annak megfelelő helyén egy megfelelő restrikciós endonukleázzal hasíthatunk, ismert módon, és a hasítás helyére beilleszthetjük a megfelelő hosszúságú klónozott cDNS-t.

Még pontosabban, a nem fuzionált polipeptid előállítására alkalmas expressziós vektort úgy állítjuk elő, hogy a humán TNF polipeptidet kódoló bázisszekvenciát tartalmazó DNS-fragment – amelynek 5'-végéhez egy ATG iniciációs kodon van adva és amely 3'-végén egy terminációs kodont (TAA, TAG vagy TGA) tartalmaz – egy megfelelő promoterral és Shine-Dalgarno-szekvenciával rendelkező DNS-fragmenshez adjuk, és egy vektorba illesztjük. A fuzionált polipeptidek előállítására alkalmas expressziós vektort úgy állítjuk elő, hogy a humán TNF polipeptidet kódoló bázisszekvenciát tartalmazó cDNS-t – amelyben a terminációs kodon a 3'-véghez van adva – úgy illesztjük a vektorba, hogy a transzlációs leolvasó szerkezet egybeessen a fuzionálandó strukturális génével. A humán TNF polipeptidet azért előnyös fuzionált polipeptidként előállítani, mert így a transzformált gazdaszervezetben minimálisra csökkenthető a termék degradálódása. Ebben az esetben a humán TNF polipeptidet ki kell vágni a fuzionált termékből. A biológiailag aktív humán TNF polipeptid – amely a 6. táblázat felső sorába a 82. helyzetben lévő Ser-tól a 236. helyzetű Leu-ig tartó aminosavszekvenciának felel meg – nem tartalmaz egy metionin-aminosavmaradékot sem. Ezért olyan expressziós vektort alkalmazva, amelyet úgy állítunk elő, hogy a humán TNF cDNS-fragmentet a fuzionálandó strukturális gén bázisszekvenciájának 3'-végéhez egy metionin-kodonon (ATG) keresztül kapcsolunk, a fuzionált termékből könnyen visszanyerhetjük a humán TNF polipeptidet a metionin-peptidkötés hasítására alkalmas módszerekkel, például bróm-cíános kezeléssel [Itakura K. és munkatársai: Science, 198, 1054 (1977)].

A promoterekre példaként a lac, trp, tac, phoS, phoA, PL és SV40-t, mint korai promotert említjük.

A transzformált sejteket úgy kapjuk, hogy az expressziós vektort egy gazdaszervezetbe – például mikroorganizmusba, állati vagy növényi sejtebe – visszük be. Az E. coli-t például Cohen és munkatársai [Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)] módszere sze-

rint transzformáljuk. Ezután a transzformált sejtek tenyésztésével előállíthatjuk a humán TNF polipeptidet, vagy egy olyan fenti polipeptidet, amelynek N-terminálisán metionin van. A termék vagy a gazdaszervezet citoplazmájában, vagy a periplazmájában halmozódik fel, attól függően, hogy az expressziós vektort milyen módszerrel szerkesztettük meg. Abból a célból, hogy a polipeptid a periplazmába választódjon ki, egy szekréciós protein génjének – például egy lúgos foszfatáz génnek (phoA) vagy foszfát-kötő protein génnek (phoS) felhasználásával úgy szerkesztjük meg az expressziós vektort, hogy a humán TNF polipeptidet kódoló DNS-t a helyes translációs leolvasó rendben a fenti génhez kapcsoljuk, egy megfelelő helyen, a szignál-peptidet kódoló DNS-régiót követően.

A kapott transzformált sejteket ezután az azok tenyésztésére alkalmas körülmények között tenyésztjük, míg a kívánt polipeptid megfelelő mennyiségben termelődik. Mikor a termelt polipeptid a citoplazmában felhalmozódott, a gazdaszelleket elroncsoljuk – például lizozimes emésztéssel, és fagyasztással és felolvasztással, vagy ultrahangos kezeléssel, vagy egy French prést alkalmazva –, majd centrifugálással vagy szűréssel összegyűjtjük az extraktumot. Ha a termék a periplazmában halmozódott fel, onnan extraháljuk, például Willsky és munkatársai [J. Bacteriol., 127, 595 (1976)] módszere szerint.

A kapott nyers peptidet ezután ismert módon tisztítjuk, például a kisózás, ultraszűrés, dialízis, ioncsere kromatográfia, géliszűrés, elektroforézis, affinitási kromatográfia, stb. kombinálásával.

A fenti eljárással humán TNF-polipeptidet és/vagy olyan polipeptidet állíthatunk elő, amely az N-terminálison metionint tartalmaz.

A humán TNF polipeptidről, és az N-terminálison metionint tartalmazó polipeptidről eltérő polipeptideket is előállíthatunk a találmány szerinti eljárással, a kívánt DNS-t lényegében a fentiek szerint használva, vagy ismert eljárások megfelelő kombinálásával.

(2) Humán TNF polipeptid módosítása

Módosított humán TNF polipeptidek alatt a humán TNF polipeptidet kódoló DNS allél mutánsaiból származtatható polipeptideket (allél mutáns polipeptidek); a humán TNF polipeptid vagy az allél mutáns polipeptid C- vagy N-terminálisához egy aminosav, vagy két vagy több aminosavat tartalmazó peptid hozzáadásával nyert polipeptideket; a humán TNF polipeptidből vagy allél mutáns polipeptidből egy vagy több aminosav törlésével nyert polipeptideket (például a humán TNF polipeptid N-terminálisán 4 aminosav törlésével nyert polipeptidet, melyet a [III-1] fejezetben a (6) pontban ismertetünk);

A humán TNF polipeptid, vagy allél mutánsának módosítását például Means, G.E. és Feeney, R.E. módszerével [“Chemical Modification of Proteins”, Holden-Day, Inc. California (1971)] végezhetjük el, ön-magában ismer módon.

[III] A találmány szerinti eljárással előállított polipeptidek jellegzetes képviselőinek kémiai és fizikai-

kémiai tulajdonságait, biológiai aktivitását és immunológiai tulajdonságait az alábbiakban ismertetjük.

A 4. példa szerint előállított, tisztított humán TNF polipeptid (továbbiakban rekombináns humán TNF, rövidítve rHu-TNF) tulajdonságait az alábbiakban ismertetjük.

[III-1] Kémiai és fizikai-kémiai tulajdonságok

(1) Molekulatömeg

Az rHu-TNF molekulatömegét géliszűréssel határoztuk meg, TSK-gélen, G3000 SW oszlopon (7,5•600 mm, Toyo Soda), nagynyomású folyadékkromatográfiás technikát alkalmazva, oldószerként 0,2 mól/l koncentrációjú foszfát-puffert (pH 7) használtunk, 8 mól/l karbamid és 0,5% 2-merkaptó-etanoltartalom mellett, vagy anélkül. Ismert molekulatömegű proteinként marha szérumalbumint (móltömeg $6,6 \cdot 10^4$), nyúl tri- α -foszfát-izomerázt (móltömeg $5,3 \cdot 10^4$), ovalbumint (móltömeg $4,5 \cdot 10^4$), sertés pepszint (móltömeg $3,27 \cdot 10^4$), szója tripszin-inhibítort (móltömeg $2,05 \cdot 10^4$), ló mioglobint (móltömeg $1,78 \cdot 10^4$) és ló citokrom C-t (móltömeg $1,24 \cdot 10^4$) használtunk.

Vizsgálataink szerint a rHu-TNF relatív móltömege $45\,000 \pm 5\,000$ dalton, karbamid és 2-merkaptó-etanol távollétében, és $18\,000 \pm 3\,000$ dalton, azok jelenlétében.

A pHTR91 expressziós plazmidba illesztett cDNS egy 155 aminosavból álló peptidláncot kódol (az iniciációs ATG kodonnak megfelelő metionint elhagyva). A rHu-TNF elméletileg számított molekulatömege 17 097 dalton, az aminosavszekvencia alapján. A számított molekulatömeg egyezik a karbamid és 2-merkaptó-etanol jelenlétében mért molekulatömegeg.

A fenti eredmények azt mutatják, hogy a rHu-TNF karbamid és 2-merkaptó-etanol jelenlétében monomerként (alegység) van jelen, míg a denaturálószerrel távollétében aggregátumot – például trimert – képez.

(2) Izoelektromos pont

Az izoelektromos pontot izoelektromos fókuszáló gél-elektroforézissel határoztuk meg, 3 watt mellett, 3 órán át, 5%-os poliakrilamid géllemez használatával, pH 4,0 – pH 6,5 tartományba eső pH-gradienssel, melyet Pharmalyte-tel (Pharmacia) állítottunk elő.

A proteint Coomassie brilliant blue festékkel festettük meg. Egy másik gél 3 mm széles csíkokra vágtuk, és a proteint 20 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl (pH 7,8) pufferoldatba merítve eluáltuk. Citotoxikus aktivitást azokból a gélseletekből származó eluátumokban észleltünk, amelyek helyzete megegyezett a festéssel detektált protein helyzetével.

A rHu-TNF izoelektromos pontja vizsgálataink szerint $5,9 \pm 0,3$.

(3) Aminosav-összetétel

A rHu-TNF aminosav-összetételét mikro-aminosav-analizátorban (Shimadzu Seisakusho) határoztuk meg, fluorometriás módszerrel, a mintát hidrogén-kloridos hidrolízis ortoftáldaldehyddel kezelve.

50 mikrogramm rHu-TNF-et 6 n hidrogén-klorid-oldattal 110 °C-on hidrolizáltunk. Az aminosav-tartalmat úgy számítottuk ki, hogy a mért értékeket a 24, 48 és 72 órán át hidrolizált mintában meghatározott értékek alapján korrigáltuk. A cisztint (vagy ciszteint) ciszteinsav formájában határoztuk meg, perhangyavas oxidáció után. A triptofánt fluormetriásan mértük, Pajot [Eur. J. Biochem., 63, 263 (1976)] módszere szerint.

Az eredményeket a 7. táblázatban foglaltuk össze.

7. táblázat

Aminosav	Relatív moláris mennyiség
Asp + Asn	12,1
Thr	5,5
Ser	12,4
Glu + Gln	20,3
Pro	10,3
Gly	10,6
Ala	13,0
Cys	1,5
Val	12,1
Met	<0,1
Ile	8,0
Leu	17,7
Tyr	6,8
Phe	3,9
His	2,8
Lys	6,1
Arg	7,5
Trp	1,6

Az aminosav-összetétel jól egyezik a humán TNF polipeptidet kódoló bázisszekvencia alapján következtetett összetétellel.

(4) N-terminális aminosavszekvencia meghatározása

A rHu-TNF N-terminális aminosavszekvenciáját Edman-lebontással határoztuk meg Arch. Biochem. Biophys., 22, 475 (1949).

Az N-terminális aminosav Edman-lebontásával nyert fenil-tiohidantoin-aminosavat nagynyomású folyadékkromatográfiás eljárással azonosítottuk, TSK-gél 120A-val (Toyo Soda) töltött 4,6•250 mm-es oszlopot használva. A fenti eljárást sorozatosan megismételve meghatároztuk az újonnan kialakult N-terminális aminosavakat, szekvenciálisan.

Vizsgálataink szerint a rHu-TNF N-terminális aminosavszekvenciája az alábbi:

NH₂-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp---

Ismert, hogy számos, rekombináns DNS-technikával mikroorganizmusokban előállított polipeptid metionin-aminosavmaradékot tartalmaz az N-terminális végén, ami az iniciációs kodonból (ATG) származik.

Az 5. példa szerint előállított rHu-TNF esetén azonban nem lehetett az N-terminálison metionint kimutatni, az onnan teljesen el lett távolítva.

(5) C-terminális aminosavszekvencia meghatározása

A rHu-TNF C-terminális aminosavszekvenciáját enzimatis lebonatással határoztuk meg, karboxipeptidáz használva.

A rHu-TNF-et karboxipeptidáz-A-val és karboxipeptidáz-Y-nal emésztettük, az enzim:szubsztrát mólárány 1:25, illetve 1:1000 volt. A rHu-TNF C-terminálisról felszabaduló aminosavakat mikro-aminosav-analizátorral (Shimadzu Seisakusho) azonosítottuk, megfelelő időközönként (2 perc – 180 perc, az emésztés kezdetétől számítva) vett mintákban.

Vizsgálataink szerint a rHu-TNF C-terminális aminosavszekvenciája az alábbi:

---Tyr-Phe-Gly-Ile-Ala-Leu-COOH

(6) rHu-TNF tripszines emésztése

500 mikrogramm rHu-TNF-et 20 mikrogramm TPCK-kezelt tripszinnel (XIII. típus, SIGMA Chemical Co.) emésztettünk, 5 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl pufferoldatban (pH 7,8), szobahőmérsékleten, 5 órán keresztül. A kapott terméket a 4. példa (2) lépésben leírtak szerint preparatív izoelektromos fókuszáló gél-elektroforézisnek vetettük alá. A proteinek Coomassie brilliant blue-val festettük. Egy másik lemezt 3 mm széles csíkokra vágunk, és a proteint 20 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl pufferrel (pH 7,8) eluáltuk.

Vizsgálataink szerint a rHu-TNF izoelektromos pontjánál kb. 0,3 pH-értékkel alacsonyabb pH értéknek megfelelő zónából eluált emésztett terméknek volt citotoxikus aktivitása.

A citotoxikus aktivitással rendelkező emésztett terméknek a fentebb ismertetett módon meghatároztuk a C-terminális és N-terminális aminosavszekvenciáját.

Vizsgálataink szerint az emésztett termék részleges aminosavszekvenciája az alábbi:

N-terminális: NH₂-Thr-Pro-Ser-Asp---

C-terminális: ---Ile-Ala-Leu-COOH.

Az aminosavszekvenciából következően az emésztett termék egy olyan polipeptid, amely a rHu-TNF-ből négy N-terminális aminosav lehasadásával keletkezik, és citotoxikus aktivitással rendelkezik. Ez azt jelenti, hogy a rHu-TNF N-terminális végén levő négy aminosav nem lényeges a biológiai aktivitás szempontjából.

[III-2] Biológiai aktivitás

(1) Egér L-M sejtekkel szembeni citotoxikus hatás

A citotoxikus aktivitást egér L-M sejtekkel (ATCC, CCL 1.2) szemben az alábbiak szerint határoztuk meg.

0,1 ml mintát az alább említett táptalajjal sorozatban hígítottunk, és a 96 lyukú lemez (Flow Labs.) minden egyes lyukába 0,1 ml 1•10⁵ sejt/ml töménységű L-M sejt szuszpenziót mértünk. Táptalajként Eagle-féle minimáltáptalajt [J. Paule: „Cell and Tissue Culture”, E and S. Livingstone Ltd. (1970)] használtunk, 1% mag-

zati marhaszérummal kiegészítve. A lemezt 37 °C-on 48 órán át inkubáltuk, 5% szén-dioxidot tartalmazó, telített páratartalmú légterben. Az inkubálás befejeztével az élő sejteket 20 mikroliter 25%-os glutaraldehyd hozzáadásával fixáltuk. A fixálás után a lemezt mostuk és szárítottuk. Ezután a fixált sejteket 0,1 ml 0,05%-os metilénkék-oldattal megfestettük. A metilénkék feleslegét lemostuk, és a lemezt szárítottuk. A fixált sejtekhez kötődött metilénkéket 200 mikroliter 0,36 n sósavoldattal eluáltuk, és a 665 nm-nél mutatott abszorpciót Titerek Multiscan (Flow Labs.) fotométerrel mértük. Az abszorpció az élő sejtek számával arányos. Az L-M sejtek 50%-ának elpusztításához szükséges koncentrációt mint 1 egység/ml-t definiáltuk. A fenti módon meghatározott, egér L-M-sejtekkel szembeni citotoxikus aktivitást a egér L-929 sejtekre kifejtett citotoxikus aktivitástól való megkülönböztetés céljából mint egység (LM)-et adjuk meg.

A proteintartalmat Lowry, O.H. és munkatársai [J. Biol. Chem., 193, 265 (1951)] módszere szerint határoztuk meg.

Vizsgálataink szerint a rHu-TNF specifikus aktivítása $2 \cdot 10^6$ egység (LM)/mg protein, vagy még ennél is magasabb érték.

(2) Egérbe transzplantált Meth A szarkóma elleni hatás

A tumorelles hatást Meth A szarkómát hordozó egéren az alábbiak szerint vizsgáltuk.

23 g átlagos súlyú BALB/c egerekbe a hasi bőr alá $2 \cdot 10^5$ Meth A szarkóma sejtet ültettünk be intradermálisan. Hét nap múlva kiválogattuk azokat az egereket, amelyekben a tumor átmérője 6–7 mm volt. A tumor beültetése utáni 7. napon a tumorba, vagy intravénásan bevittük a rHu-TNF-et. A rHu-TNF endotoxon-tartalma kisebb, mint $0,01 \text{ ng}/1 \cdot 10^4$ egység (LM).

Abban az esetben, mikor a tumorba magába vittük be a rHu-TNF-et, $1 \cdot 10^3$, $3 \cdot 10^3$ és $1 \cdot 10^4$ egység (LM)/egér dózisban, 24 órával az injektálás után min-

den egérben tumornekrózist észleltünk, és a tumor az egyes dózisok alkalmazása esetén 3/5, 5/5, illetve 5/5 arányban teljesen visszafejlődött. Intravénás kezelés esetén $3 \cdot 10^3$ és $1 \cdot 10^4$ egység (LM)/egér dózisok alkalmazása mellett minden egérben észleltük a nekrotikus választ, a teljes visszafejlődés aránya 3/5, illetve 4/5 volt.

(3) rHu-TNF humán tumor-sejtekre kifejtett gátló hatása in vitro

A rHu-TNF humán tumor-sejtekre és normál sejtekre kifejtett növekedésgátló hatását in vitro az alábbiak szerint vizsgáltuk.

24 lyukú lemez minden egyes lyukába 1 ml, 10% magzati marhaszérumot tartalmazó Eagle-minimáltáptalajt mértünk, és lyukanként $1 \cdot 10^4$ sejttel – humán tumor-sejttel vagy normál sejttel – beoltottuk. A rHu-TNF-et 100 egység (LM)/ml végkoncentrációban hozzáadtuk, és a sejteket 37 °C-on 4 napon át inkubáltuk, 5% szén-dioxidot tartalmazó teljesen telített páratartalmú légterben. A tenyésztés befejezte előtt 4 órával minden lyukba 1 mikrocurie ^3H -timidint adtunk. A tenyésztés befejezése után a sejteket foszfát-pufferes sóoldattal mostuk, és 0,5% nátrium-dodecil-szulfáttal lizáltuk. A sejtekbe beépült ^3H -timidin mennyiségét a lizátum radioaktivitásának mérésével határoztuk meg.

Az inhibitor hatást, melyet a növekedésgátlás arányával adtunk meg, a következő egyenlet segítségével számoltuk ki:

Növekedésgátlás aránya (%) = $(a-b)/a \cdot 100$, ahol
a az rHu-TNF távollétében,
b az rHu-TNF jelenlétében beépült radioaktivitást jelenti.

Az eredményeket a 8. táblázatban foglaltuk össze: A fenti eredmények azt mutatják, hogy a rHu-TNF jelentős mértékben gátolja a humán tumor-sejtek növekedését, míg a normál sejtekre nézve hatástalan. A fentiek szerint a rHu-TNF szelektíven a tumoros sejteket támadja meg.

8. táblázat

Humán sejt	Eredet	Növekedésgátlás aránya (%)
Normál sejtek		
WI-38	(ATCC CCL 75) tüdő diploid	nincs gátlás
MRC-5	(ATCC CCL 171) tüdő diploid	nincs gátlás
IMR-90	(ATCC CCL 186) tüdő diploid	nincs gátlás
Tumor-sejtek		
G-361	(ATCC CRL 1424) melanoma	75
HT-1376	(ATCC CRL 1472) hólyag karcinóma	49
ZR-75-1	(ATCC CRL 1500) mell karcinóma	97
HOS	(ATCC CRL 1543) csont szarkóma	47
WiDr	(ATCC CCL 218) vastagbél adenokarcinóma	37
MCF7	(ATCC HTB 22) mell adenokarcinóma	69
G-402	(ATCC CRL 1440) vese leiomioblasztóma	98
PANC-1	(ATCC CRL 1469) hámszerű karcinóma	59
HeLa	(ATCC CCL 2) hámszerű karcinóma	31

[III-3] Immunológiai sajátosságok

100 egység (LM)/ml koncentrációjú rHu-TNF-oldatot azonos térfogatú, 100-szoros hígítású, tisztított nyúl plazma TNF elleni antitesttel kevertünk össze, melyet a 4. referencia példa szerint állítottuk elő. 37 °C-on 2 órás inkubálás után a fent ismertetett módon, célsejt-ként L-M sejteket használva meghatároztuk a reakcióelegy citotoxikus aktivitását.

Vizsgálatai eredményeink szerint a rHu-TNF citotoxikus hatását az antitest egyáltalán nem semlegesítette, ebből a tényből arra következtethetünk, hogy a humán TNF polipeptid immunológiailag megkülönböztethető a nyúl TNF-tól.

[IV] A találmány szerinti eljárással előállított polipeptideket oldat vagy liofilizált termék formájában állíthatjuk elő, amelyekből gyógyszerkészítményeket készíthetünk. A hosszú távú stabilitás szempontjából kedvezőbb, ha a termék liofilezett formában van. A termékhez előnyösen hordozóanyagot és stabilizálószereket is adunk. Stabilizálószerként például albumint, globulint, zselatint, protamint, protaminsókat, glükózt, galaktózt, xilózt, mannitot, glukuronsavat, trehalózt, dextránt, hidroxil-etil-keményítőt, és nemionos felületaktív szereket – például poli(oxi-etilén)-zsírsav-észtereket, poli(oxi-etilén)-alkil-étereket, poli(oxi-etilén)-alkil-fenil-étereket, poli(oxi-etilén)-szorbitán-zsírsav-észtereket, poli(oxi-etilén)-gliceril-zsírsav-észtereket, poli(oxi-etilén)-hidrogénezett ricinusolajat, poli(oxi-etilén)-ricinusolajat, poli(oxi-etilén)-poli(oxi-propilén)-alkil-étereket, poli(oxi-etilén)-poli(oxi-propilén) blokk-kopolimereket, szorbitán, zsírsav-észtereket, szacharóz-zsírsav-észtereket és gliceril-zsírsav-észtereket – használhatunk.

[V] A találmány szerinti eljárással előállított polipeptid tumorsejtekkel szemben szelektív citotoxikus hatással rendelkezik, és tumoros állatokban a tumort visszafejleszti, fenti hatásuk következtében gyógyszerkészítmények hatóanyagaként tumorelleses szerként használhatók.

A polipeptid készítményeket parenterálisan vagy helyileg alkalmazhatjuk. Parenterális – például intravénás vagy intramuszkuláris – alkalmazást akkor választunk, ha a tumorsejtek nagy területen szóródtak szét vagy metasztázisban vannak, vagy a metasztázist akarjuk megakadályozni. Helyi tumoros szöveteket előnyösen közvetlen intratumoros alkalmazással kezeljük. A dózis a tumorok típusától és nagyságától, a beteg állapotától és az alkalmazás módjától függően változik. Rendszerint a dózis $1 \cdot 10^2$ – $1 \cdot 10^7$ egység (LM)/kg, előnyösen $1 \cdot 10^3$ – $1 \cdot 10^6$ egység (LM)/kg.

A találmány szerinti eljárást közelebbről az alábbi példák és referenciapéldák segítségével kívánjuk ismertetni a korlátozás szándéka nélkül.

A példák könnyebb megértése céljából a leírást az 1–5. ábrákkal is kiegészítettük.

Az 1. ábra

a DNS-fragmensek előállítására használt restrikciós endonukleáz hasítási helyeit mutatja, és a humán TNF polipeptidet kódoló klónozott cDNS bázisszekvenciá-

jának meghatározása során a szekvenálás irányát és mértékét [1-(9). példa].

A 2. ábrán

a pHTT26 expressziós plazmid kialakítására szolgáló eljárást mutatjuk be [2-(1). példa].

A 3. ábra

a pHTR91 expressziós plazmid kialakítására szolgáló eljárást szemlélteti [2-(2). példa].

A 4. ábrán

a pHTS115 expressziós plazmid előállítási eljárása látható [2-(3). példa].

Az 5. ábra

a pHTS37 expressziós plazmid előállítási eljárását mutatja [2-(4). példa].

1. példa

(1) TNF mRNS előállítása humán alveolus makrofágokból

A humán alveoláris makrofágokat foszfáttal puffertolt sóoldattal végzett broncho-alveoláris öblítéssel gyűjtjük össze. Az alveoláris makrofágokat – $6,3 \cdot 10^7$ sejtet – 10% magzati marhaszérumot tartalmazó RPMI-1640 táptalajban szuszpendáljuk, és 8 cm átmérőjű Petri-csészére oltjuk, $9 \cdot 10^6$ sejt/csésze sejtsűrűséget biztosítva. A tenyésztet 37 °C-on 1 órán át előtenyésztjük, 5% szén-dioxidot tartalmazó, telített páratartalmú légterben. Ezután a csészébe 10 mikrogramm/ml végkoncentrációban endotoxint (E. coliból származó lipopoliszacharidot), 10 ng/ml végkoncentrációban TPA-t (forbol-12-mirisztát-13-acetátot) és 1 mikrogramm/ml végkoncentrációban cikloheximidet (proteinszintézis-inhibitor) mérünk. A tenyésztést 4–4,5 órán át tovább folytatjuk (a teljes tenyésztési idő 5–5,5 óra). A tápfolyadékot leszívjuk, és a csészéhez tapadt makrofágokat 0,6% nátrium-N-lauroil-szarkozinátot és 6 mmól/l nátrium-citrátot tartalmazó 5 móll/l koncentrációjú guanidil-tiocianát-oldattal lízáljuk és homogenizáljuk. A homogenizátumot 0,1 móll/l EDTA-t tartalmazó 5,7 móll/l koncentrációjú cézium-klorid-oldatra öntjük, és 20 órán át 26 500 fordulat/perc sebességgel centrifugáljuk, ultracentrifugában (RPS27-2 rotor, Hitachi Koki), a teljes RNS-frakciót szemcse formájában kapjuk. A szemcsét kis mennyiségű, 0,35 móll/l nátrium-kloridot, 20 mmól/l Tris-HCl-t (pH 7,4) és 20 mmól/l EDTA-t tartalmazó 7 móll/l koncentrációjú karbamidoldatban oldjuk, és etanolból kicsapva visszanyerjük. 159 mikrogramm össz-RNS-t kapunk a fenti módon.

Az össz-RNS-frakciót 1 ml, 1 mmól/l EDTA-t tartalmazó 10 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferben (pH 7,4) – továbbiakban TE-oldatként említjük – oldjuk, és az oldatot 65 °C-on 5 percen keresztül melegítjük. Az oldathoz 0,5 móll/l végkoncentrációban nátrium-klorid-oldatot adunk, és az elegyet először 0,5 móll/l nátrium-kloridot tartalmazó TE-oldattal ekvilibrált oligo(dT)-cellulóz-oszlopra visszük. Az oszlopról TE-oldattal 8 mikrogramm poli(A)mRNS-t eluálunk.

A poli(A)mRNS-t 1,9 ng/ml koncentrációban desztillált vízben oldjuk, és az oldatot mikroinjekciós módszerrel közel 50 nl/oocita dózisban beinjektáljuk a Xe-

nopus laevis oocitáiba. 10 oocitát 100 mikroliter Barth-táptalajban [J.B. Gurdon; J. Embryol. Exp. Morphol., 20, 401 (1968)] 22 °C-on 24 órán át inkubálunk. Az oocitákat homogenizáljuk és 10000 fordulat/perc sebességgel 10 percen át centrifugáljuk. A felülúszó TNF-aktivitását úgy határozzuk meg, hogy mérjük az egér L-929 sejtekre kifejtett citotoxikus aktivitást.

Az egér L-929 sejtekkel szembeni citotoxikus hatást az alábbiak szerint mérjük.

0,1 ml mintát az alább említett táptalajjal sorozathígítunk, majd a 96 lyukú lemez (Flow Labs.) minden egyes lyukába 0,1 ml, $5 \cdot 10^5$ sejt/ml töménységű L-929 sejt-szuszpenziót mérünk. Táptalajként 1% magzati marhaszérumot tartalmazó Eagle-féle minimáltáptalajt használunk. A lemezt 38,5 °C-on 18 órán át inkubáljuk, 5% szén-dioxidot tartalmazó, telített páratartalmú légkörben.

Az élő L-929 sejtek számát, és a biológiai aktivitás kiszámítását ugyanúgy végezzük, mint azt a [III-2-(1)] fejezetben az egér L-M sejtekkel végzett citotoxikus aktivitás meghatározásával kapcsolatban már leírtuk.

A fenti módon, egér L-929 sejtekre kifejtett citotoxikus aktivitást egység (L-929)-ként adjuk meg, az egér L-M sejtekkel szembeni citotoxikus hatástól való megkülönböztetés miatt.

A fenti módon előállított felülúszó citotoxikus aktivitása 6,6 egység (L-929)/ml. Ez azt jelenti, hogy a poli(A)-mRNS készítmény TNP mRNS-t tartalmaz.

(2) cDNS szintézis

Az (1) lépésben kapott poli(A)mRNS-t templátként használva a komplementer DNS-t Gubler és Hoffman [Gene, 25, 263 (1983)] módszere szerint szintetizáljuk.

6 mikrogramm poli(A)mRNS-t 40 mikroliter, 10 mmól/l magnézium-kloridot, 10 mmól/l ditiotreitolt, 4 mmól/l nátrium-pirofoszfátot, 1,25 mmól/l dGTP-t, 1,25 mmól/l dATP-t, 1,25 mmól/l dTTP-t, 0,5 mmól/l dCTP-t, 167 nmól/l α - 32 P-dCTP-t (fajlagos radioaktivitása 3000 Ci/mmól), 4 mikrogramm oligo(dT)₁₂₋₁₈-at és 120 egység reverz transzkriptázt (madár mieloblasztózis vírusból (AMV)) tartalmazó 50 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferben (pH 8,3) oldunk, és az oldatot 43 °C-on 30 percen át inkubáljuk. Ezután a reakciót EDTA hozzáadásával leállítjuk. A reakcióelegyet 1:1 arányú fenol-kloroform eleggyel extraháljuk, és a vizes fázishoz 2,5 mól/l végkoncentrációban ammónium-acetátot adunk. A kapott cDNS-mRNS hibridet a vizes fázisból etanolos kicsapással nyerjük vissza. A cDNS-mRNS hibrid csapadékot 100 mikroliter, 5 mmól/l magnézium-kloridot, 10 mmól/l ammónium-szulfátot, 100 mmól/l kálium-kloridot, 0,15 mmól/l β -nikotinamid-adenin- dinukleotidot, 5 mikrogramm marha szérumalbumint, 0,04 mmól/l dGTP-t, 0,04 mmól/l dATP-t, 0,04 mmól/l dTTP-t, 0,04 mmól/l dCTP-t, 0,9 egység E. coli ribonukleáz H-t és 23 egység E. coli DNS-polimeráz I-et tartalmazó 20 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferben (pH 7,5) oldjuk, és 12 °C-on 60 percen át, majd 22 °C-on 60 percen át inkubálva dscDNS-t szintetizálunk. A reakciót EDTA hozzáadásával állítjuk le. A dscDNS-t fenol-kloroform

eleggyel extraháljuk, és etanolból kicsapva nyerjük vissza, mint azt fent leírtuk.

(3) Oligo(dC)-végű cDNS előállítása

A fenti lépésben kapott dscDNS-t 100 mikroliter, 2 mmól/l kobalt-kloridot, 0,2 mmól/l ditiotreitolt, 0,1 mól/l α - 32 P-dCTP-t (fajlagos radioaktivitása 3 Ci/mmól), és 10 egység terminális dezoxinukleotidil-transzferázt tartalmazó 100 mmól/l koncentrációjú nátrium-kakodilát-pufferben (pH 7,2) oldjuk, és 37 °C-on 30 percen át inkubáljuk, hogy a dscDNS 3'-végehez hozzákapcsolódjon az oligo(dC)-vég.

A reakciót EDTA hozzáadásával leállítjuk. Az oligo(dC)-végű dscDNS-t fenol-kloroform eleggyel extraháljuk, és etanolból kicsapva visszanyerjük. Az oligo(dC)-végű dscDNS-t 2 mikrogramm/ml végkoncentrációban 1 mmól/l EDTA-t, és 100 mmól/l nátrium-kloridot tartalmazó 10 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferben (pH 7,4) oldjuk.

(4) Oligo(dG)-végű pBR322 DNS előállítása

10 mikrogramm pBR322 DNS-t mikroliter, 10 mmól/l magnézium-kloridot, 50 mmól/l ammónium-szulfátot és 10 mikrogramm marha szérumalbumint tartalmazó 20 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferben (pH 7,4) oldunk, és 15 egység restrikciós endonukleáz PstI-et adunk hozzá. Az elegyet 37 °C-on 1 órán át inkubáljuk. A reakció befejeződése után a reakcióelegyet fenol-kloroform eleggyel extraháljuk és a vizes fázisból a kapott DNS-t etanolból végzett kicsapással nyerjük vissza. A kapott DNS-t 200 mikroliter, a dscDNS oligo(dC)-véggel való ellátásánál használt pufferével azonos összetételű, de még 80 egység terminális dezoxinukleotidil-transzferázzal kiegészített, és 32 P-dCTP helyett 3 H-dGTP-t tartalmazó pufferben oldjuk, és 37 °C-on 20 percen át inkubálva a 3'-végehez egy 10–15 dezoxiguanilsav-maradékból (dG) álló végcsoportot kapcsolunk. A reakcióelegyet fenol-kloroform eleggyel extraháljuk, és az oligo(dG)-végű pBR322 DNS-t a vizes fázisból etanolból végzett kicsapással visszanyerjük. A kapott, végcsoporttal ellátott pBR322 DNS-t az oligo(dC)-végű dscDNS oldására használt pufferével azonos összetételű pufferben oldjuk, 20 mikrogramm/ml végkoncentrációban.

(5) Rekombináns plazmid előállítása

120 mikroliter oligo(dC)-végű cDNS-oldatot azonos térfogatú oligo(dG)-végű pBR322 DNS-oldattal elegyítünk, és az elegyet 65 °C-on 5 percen át, majd 57 °C-on 120 percen át inkubálva hőkezeljük, és kialakítjuk a rekombináns plazmidot.

(6) Transzformált sejtek kiválasztása

A fenti módon kapott rekombináns plazmiddal E. coli χ 1776 törzset transzformálunk, az alábbiak szerint.

Az E. coli χ 1776 törzset 20 ml, 100 mikrogramm/ml diamino-pimelinsavval és 40 mikrogramm/ml timidinnel kiegészített L-táptalajban (összetétel: 10 g tripton, 5 g élesztő kivonat, 5 g nátrium-klo-

rid és 1 g glükóz/l liter táptalaj; pH 7,2) tenyésztjük, míg a tenyészet zavarossága eléri a 0,5 értéket 600 nm-en. A sejteket 4 °C-on centrifugálással összegyűjtjük és 10 ml, 50 mmól/l kalcium-kloridot tartalmazó 10 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,3) mossuk. A sejteket 2 ml azonos összetételű pufferben szuszpendáljuk, és 0 °C-on 5 percen át állni hagyjuk. 0,2 ml fenti szuszpenzióhoz 0,1 ml (5) lépésben kapott rekombináns plazmid-oldatot adunk. Az elegyet 0 °C-on 15 percen át állni hagyjuk, s majd 2 percen át 42 °C-on tartjuk. Ezután hozzáadunk 0,5 ml kiegészített L-táptalajt, és a sejteket 1 órán át rázatva tenyésztjük. A tenyészetből mintát veszünk, 15 mikrogramm/ml tetraciklint tartalmazó, kiegészített L-táptalajos agarlemezre rétegezzük és 37 °C-on 12 órán át tenyésztjük. A cDNS génállományt a tetraciklin-rezisztens transzformált sejtek kiválasztásával kapjuk.

(7) Humán TNF cDNS klónozása

A fenti módon kapott cDNS génállományból telep-hibridizációs vizsgálattal választjuk ki a humán TNF polipeptidet kódoló cDNS-t tartalmazó rekombináns plazmidot befogadó transzformált sejteket, a hibridizálásra mintaként nyúl TNF-et kódoló klónozott cDNS-ből előállított DNS-fragmenseket használunk.

Közelebből, a nyúl TNF-et kódoló cDNS-t az 1. referenciapéldában leírtak szerint izoláljuk rekombináns pRTNF802 plazmidból. Bázisszekvenciája a 3. táblázatban látható. A cDNS-t Aval vagy HaeII restrikciós endonukleázzal emésztjük. Az emésztett DNS-fragmenseket etanolból kicsapva nyerjük vissza. A kívánt DNS-fragmenseket poliakrilamid gél-elektroforézissel izoláljuk.

A 3. táblázatban látható, 285–583. bázisszekvenciának megfelelő DNS-fragmentet (299 bázispár) Aval restrikciós endonukleázzal végzett lebontással kapjuk, és a továbbiakban AvaI-fragmensnek nevezzük. A 3. táblázat 33–120. bázisszekvenciájának megfelelő másik DNS-fragmentet (88 bázispár) HaeII restrikciós endonukleázzal végzett emésztéssel nyerjük, a továbbiakban HaeII-fragmensnek nevezzük. Az AvaI-fragmentet és HaeII-fragmentet ³²P-vel jelezzük. A jelzett DNS-fragmenseket használjuk mintaként a humán TNF polipeptidet kódoló cDNS-t tartalmazó plazmidot befogadó transzformált sejtek kiválasztására a cDNS génállományból, a Hanahan és Meselson Gene, 10, 63 (1980) módszere szerint végzett telep-hibridizációs vizsgálatban.

Közel 20 000 klón közül 43 klónt szelektáltunk az első vizsgálatban, ³²P-jelzett AvaI-fragmentet használva mintaként. A kapott 43 klónt a második vizsgálatban mintaként ³²P-jelzett HaeII-fragmentessel hibridizáltuk.

Végül 6 olyan cDNS-t tartalmazó rekombináns plazmidot befogadó klónt szelektáltunk, amely erősen hibridizált mind a kétféle nyúl TNF cDNS-fragmentessel.

(8) Expresszió

A (7) lépésben leírtak szerint szelektált hat transzformált klónból Wilkie és munkatársai [Nucleic Acid Res., 7, 859 (1979)] módszere szerint izoláltuk a rekombi-

náns plazmid DNS-eket, melyeket pHTNF1, pHTNF4, pHTNF5, pHTNF13, pHTNF22, illetve pHTNF26 plazmidnak neveztünk el. Minden egyes rekombináns plazmidot E. coli HB101 törzsbe viszünk be, a (6) lépésben leírt módon, a rekombináns plazmidokat befogadó transzformált sejtek előállítása céljából.

A transzformált sejteket 50 ml LB-táptalajban (összetétel: 10 g tripton, 5 g élesztő kivonat és 10 g nátrium-klorid/l liter táptalaj; pH 7,5) tenyésztjük, míg a tenyészet zavarossága 600 nm-en eléri a 0,8 értéket. Ezután a kb. 3–5·10¹⁰ sejtet összegyűjtjük, és Nagata és munkatársai [Nature, 284, 316 (1980)] módszere szerint lizáljuk, csekély változtatással. A sejteket 1 ml, 0,1% lizozimet és 30 mmól/l nátrium-kloridot tartalmazó 50 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferben (pH 8,0) újrászuszpendáljuk. A szuszpenziót 30 percen át jeges vízben állni hagyjuk, majd a sejteket hatszor megismételt fagyasztással és felolvasztással feltárjuk. A sejt-törmeléket centrifugálással eltávolítva tiszta lizátumot kapunk. A transzformált sejtekből a fenti módon előállított lizátumot L-929 sejteket használva citotoxikus aktivitás szempontjából megvizsgáljuk.

Vizsgálataink szerint a pHTNF13 plazmidot befogadó transzformánsból előállított lizátum citotoxikus aktivitása 186,1 egység (L-929)/ml.

(9) Klónozott cDNS bázisszekvenciájának meghatározása

A pHTNF13 rekombináns plazmidot a fent leírt módon izoláljuk. A plazmid DNS-t PstI restrikciós endonukleázzal hasítva izoláljuk a vektorba illesztett klónozott cDNS-t. A klónozott cDNS-fragmentet különféle restrikciós endonukleázokkal tovább hasítjuk, és a kapott 16 fragmens bázisszekvenciáját Maxam-Gilbert módszerrel meghatározzuk.

Az 1. ábra a fragmensek előállítására használt restrikciós endonukleázok hasítási helyeit mutatja, és a szekvenciameghatározás irányát a nyilak jelzik. A bekeretezett terület a humán TNF prekursor polipeptidet kódoló régiót jelenti. A meghatározott bázisszekvenciát, és az abból következtetett aminosavszekvenciát a 4. táblázat mutatja. A humán TNF polipeptidet kódoló régiót a nyúl TNF-et kódoló bázisszekvenciával mutatott homológia alapján határozzuk meg.

A humán TNF polipeptidet kódoló DNS kódolja a 233 aminosav-maradékból álló prekursor polipeptidet. A biológiailag aktív humán TNF polipeptid a prekursor polipeptid karboxil-végétől számított 155 aminosav-maradékból álló polipeptidnek felel meg, amelyet a 4. táblázat 235–699. bázisából álló bázisszekvencia kódol (a 4. táblázatban a zárójelbe tett régió). A humán TNF polipeptidet kódoló utolsó kodont követő terminációs kodon egy TGA kodon.

(10) A humán TNF polipeptid immunológiai tulajdonságai

A fenti módon kapott lizátumban a humán TNF polipeptid nyúl plazma TNF elleni antitesttel adott immunológiai keresztreakcióját az alábbiak szerint vizsgáljuk.

A lizátumhoz azonos térfogatú 100-szoros hígítású, tisztított nyúl plazma TNF elleni antitestet adunk, melyet a 4. referenciapélda szerint állítottunk elő. Az elegyet 37 °C-on 2 órán át inkubáljuk, majd a reakcióelegy citotoxikus aktivitását a fent leírt módon, célsejt-ként L-929 sejtet használva meghatározzuk. Kontroll

5 TNF-készítményként a 2. referenciapélda szerint előállított, előzetesen foszfát-pufferrel hígított nyúl plazma TNF-et használunk. Mint az alábbi eredmények mutatják, a humán TNF polipeptid citotoxikus aktivitását az antitest nem semlegesítette.

Minta	Nyúl plazma TNF elleni antitest	Citotoxikus aktivitás* [egység (L-929)/ml]
pHTNF13 plazmidot befogadó transzformáns lizátuma	nincs hozzáadva	186,1
nyúl plazma TNF	hozzáadva	191,0
	nincs hozzáadva	572,3
	hozzáadva	<0,1

* a citotoxikus aktivitást a vizsgált eredeti oldatminta aktivitásaként adtuk meg.

2. példa

Humán TNF polipeptid előállítása *Escherichia coli* sejtben

(1) Expresszió tac promotor szabályozás mellett

A klónozott cDNS-t – mint azt az 1. példában említettük – a rekombináns pHTNF13 plazmidból izoláljuk. A cDNS-t EcoRI restrikciós endonukleázzal tovább emésztjük, hogy a TNF-et kódoló régiótól lefelé eső nem-kódoló régió egy részét lehasítsuk. A kapott DNS-fragmenset (kb. 1100 bázispár) egy pBR322 plazmidból PstI és EcoRI restrikciós endonukleázos emésztéssel előállított nagyobb DNS-fragmensbe illesztve olyan rekombináns plazmidot nyerünk, amelyben TNF cDNS és egy tetraciklin-rezisztencia gén van, a fenti plazmidot pHT113-nak nevezzük.

A biológiai aktív humán TNF polipeptidet kódoló cDNS-t hordozó pHTT26 expressziós plazmid előállítását a 2. ábrán szemléltetjük.

A pHT113-ből izolált cDNS-t Aval és HindIII restrikciós endonukleázokkal emésztjük, és a kapott DNS-fragmenst (578 bázispár), amely a biológiai aktív humán TNF polipeptidet kódoló régió nagy részét tartalmazza (továbbiakban HTNF-fragmensnek nevezzük), poliakrilamid gél-elektroforézissel izoláljuk.

A tac promotor régiót magában foglaló DNS-fragmenst az alábbiak szerint izoláljuk.

300 mikrogramm pDR540 plazmid DNS-t [P-L Biochemicals; Russell, D.R. és munkatársai: Gene, 20, 231 (1982)] 2 ml, 50 mmól/l nátrium-kloridot, 6 mmól/l magnézium-kloridot és 6 mmól/l 2-merkapto-etanolt tartalmazó 10 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl pufferben (pH 7,5) oldunk, és EcoRI és BamHI restrikciós endonukleázokkal 37 °C-on 60 percen át inkubálva emésztjük. Az elegyhez 0,3 mól/l végkoncentrációban nátrium-kloridot adunk, majd az emésztett DNS-fragmenseket etanolból visszanyerjük. A tac promotor régiót magában foglaló DNS-fragmenst poliakrilamid gél-elektroforézissel izoláljuk, a hozam 8,3 mikrogramm.

A tac promotor fragmenst kémiai szintetizált, 5'-GATCCATGTCATCTTCTCGAACC 3'-GTACAGTAGAAGAGCTTGGGGCT

20 képletű oligodezoxiribonukleotid adapterrel kapcsoljuk össze. A fenti adapter egy ATG iniciációs kodont és a biológiai aktív humán TNF polipeptidet kódoló bázisszekvenciának 5'-terminális részét foglalja magában, és BamHI és Aval kohéziós terminálisokkal rendelkezik. A kapott DNS-fragmenst a továbbiakban tac promotor-adapter-fragmensnek nevezzük.

25 Fentiekéntől függetlenül, egy kb. 4300 bázispárból álló, nagyobb, ampicillin-rezisztencia gént magában foglaló DNS-fragmenst vágunk ki pBR322 plazmidból, HindIII és EcoRI restrikciós endonukleázokkal végzett emésztéssel, és a fragmenst alacsony olvadáspontú agarózt (0,7%) használva, gél-elektroforézissel izoláljuk. A fenti fragmenst a továbbiakban pBR322-Amp^r-fragmensnek nevezzük.

35 1 mikrogramm HTNF-fragmenst és 6 mikrogramm pBR322-Amp^r-fragmenst 6,6 mmól/l magnézium-kloridot tartalmazó, 66 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl pufferben (pH 7,6) oldunk, és az oldatot 55 °C-on 10 percen át inkubáljuk. Az elegyhez ezután 1 mmól/l ATP-t és 10 mmól/l ditiotreitolt, továbbá 168 egység T4 DNS-ligázt adunk, és 22 °C-on 120 percen át inkubáljuk. A kapott DNS-fragmenst fenolos extrakcióval nyerjük vissza, a hozam 4 mikrogramm. 0,8 mikrogramm DNS-fragmenst 0,3 mikrogramm tac promotor-adapter-fragmenssel kapcsolunk össze, a fentiekben alkalmazott körülmények között, azzal az elteréssel, hogy 63 egység T4 DNS-ligázt használunk. A reakcióelegyet desztillált vízzel 6-szorosára hígítjuk, és azonos térfogatú, kalciummal kezelt *E. coli* JM103 sejtuszpenzióval (P-L Biochemicals) elegyítjük. Az elegyet jeges vízfürdőn 20 percen át, majd 42 °C-on 1 percen át, végül szobahőmérsékleten 10 percen át inkubáljuk, és LB-táptalajt adunk hozzá. Az elegyet 37 °C-on 60 percen át rázatjuk. A kapott sejtuszpenzióból vett mintát 25 mikrogramm/ml ampicillint tartalmazó, LB-táptalajos agar-lemezre rétegezzük, és egy éjszakán át 37 °C-on tenyésztjük. Az ampicillin-rezisztens telepeket szelektáljuk.

60 A humán TNF polipeptid termelésére képes transzformánsok egyikét JM103/pHTT26-nak nevezzük.

Az *E. coli* JM103 sejtek kalciumos kezelését az alábbiak szerint végezzük. 5 ml L-táptalajba *E. coli* JM103 sejteket oltunk, és egy éjszakán át 37 °C-on tenyésztjük. A kapott tenyészet 1 ml-ét 100 ml LB-táptalajba oltjuk, és a tenyésztést 37 °C-on addig folytatjuk, míg a 650 nm-en mért zavarosság eléri a 0,6 értéket. A tenyészetet 30 percen át jeges vízben állni hagyjuk, majd a sejteket centrifugálással összegyűjtjük és 50 ml 50 mmól/l koncentrációjú kalcium-klorid-oldatban szuszpendáljuk, majd 60 percen át 0 °C-on tartjuk. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük, 10 ml, 20% glicerint tartalmazó 50 mmól/l koncentrációjú kalcium-klorid-oldatban újrászuszpendáljuk. A kapott sejtuszuspenziót használjuk kalciummal kezelt *E. coli* JM103 sejt-szuspenzióként a fentiekben.

A JM103/pHTT26 transzformánst egy éjszakán át 37 °C-on tenyésztjük, LB-táptalajban. A tenyészet 0,5 ml-ét 5 ml friss LB-táptalajba oltjuk, és 37 °C-on 1 órán át tovább tenyésztjük. A tenyészethez ezután 1 mmól/l végkoncentrációban izopropil- β -D-tiogalaktozidot adunk, és a tenyésztést 4 órán át tovább folytatjuk. A sejteket összegyűjtjük, és 1 ml, 0,1% lizozimet és 30 mmól/l nátrium-kloridot tartalmazó, 50 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferben (pH 8,0) szuszpendáljuk, majd 0 °C-on 30 percen át állni hagyjuk. A szuszpenziót ezután száraz-jég/etanol fürdőn lefagyasztjuk, majd 37 °C-on felolvasztjuk, és a fagyasztás-felolvasztás műveletét 6-szor megismételjük, a sejttörmelékcentrifugálással eltávolítva tiszta lizátumot kapunk. A lizátumot citotoxikus aktivitása $9,9 \cdot 10^4$ egység (L-929)/ml. A fenti citotoxikus aktivitást nem semlegesítette a 4. referenciapélda szerint előállított, nyúl plazma TNF elleni antitest, ami azt bizonyítja, hogy a humán TNF polipeptid nem ad immunológiai keresztreakciót nyúl plazma TNF-fel.

(2) Expresszió *trp* promotor szabályozás mellett

A pHTR91 expressziós plazmidot a 3. ábrán szemléltetett eljárással állítottuk elő.

A pHT113 rekombináns plazmidot Aval és Sall restrikciós endonukleázokkal végzett emésztéssel 3, körülbelül 800, 1300, illetve 2600 bázispárt tartalmazó fragmensre hasítjuk. Az 1300 bázispárból álló DNS-fragmenst, amely a biológiailag aktív humán TNF polipeptidet kódoló régió túlnyomó részét, és a tetraciklin-rezisztencia gén egy részét tartalmazza, és melyet a továbbiakban Aval-Sall-fragmensnek nevezünk, izoláljuk, és egy kémiai szintetizált,

5'-CGATATGTCATCTTCTCGAACC

3'-TATACAGTAGAAGAGCTTGGGGCT

képletű oligodezoxiribonukleotid adapterrel – továbbiakban I. adapterrel – kapcsoljuk össze.

A kapott DNS-fragmenst a továbbiakban HTNF-adapter-fragmensnek nevezzük.

Ettől függetlenül, a pDR720 plazmidból [P-L Biochemicals; Russell, D.R. és munkatársai: Gene, 20, 231 (1982)] EcoRI és HpaI restrikciós endonukleázokkal végzett emésztéssel kihalásztuk a *trp* promotor régió egy részét magában foglaló, 35 bázispárt tartalmazó DNS-fragmenst, és egy kémiai szintetizált,

5'-AACTAGTACGCAAGTTCACGTAAAAAG
GGTAAT

3'-TTGATCATGCGTTCAAGTGCATTTTCCCAT
ATTAGC

5 képletű adapterrel kapcsoljuk össze. A kapott DNS-fragmenst a továbbiakban *trp* promotor-fragmensnek nevezzük.

A pBR322 plazmidot EcoRI és Sall restrikciós endonukleázokkal emésztjük, és a nagyobb, kb. 3700 bázispárt tartalmazó DNS-fragmenst izoláljuk. A fenti DNS-fragmens, azaz a HTNF-adapter-fragmens, a *trp* promotor-fragmens és a nagyobb pBR322 fragmens szekvenciális kapcsolásával egy pHTR91 expressziós plazmidot kapunk. Az expressziós plazmidot az (1) pontban leírt módon *E. coli* HB101 sejtekbe visszük be, a transzformánsok egyikét HB101/pHTR91-nek nevezzük.

A HB101/pHTR91 transzformánst egy éjszakán át 37 °C-on módosított M-9 táptalajban (összetétel: 0,7% dinátrium-hidrogén-foszfát $\cdot$ 12H₂O, 0,3% kálium-dihidrogén-foszfát, 0,05% nátrium-klorid, 0,1% ammónium-klorid, 2 mg/l B₁-vitamin, 0,45% kazaminosav, 1 mmól/l magnézium-szulfát, 0,1 mmól/l kalcium-klorid és 0,5% glükóz) tenyésztjük. A tenyészet 0,05 ml-ével 5 ml azonos összetételű táptalajt oltunk be, és 37 °C-on 1 órán át tenyésztjük. A tenyészethez ezután 20 mikrogramm/ml végkoncentrációban 3- β -indolacilsavat adunk, és a tenyésztést 4 órán át folytatjuk. A sejteket az (1) pontban leírtak szerint összegyűjtve és kezelve tiszta lizátumot kapunk.

A lizátumot citotoxikus aktivitása $1,01 \cdot 10^6$ egység (L-929)/ml.

(3) Expresszió *phoS* promotor szabályozás mellett

A szignál-peptiddel, és egy foszfát-kötő protein N-terminális részével fuzionált humán TNF polipeptidet termelésére képes, és a fuzionált proteint a gazdasejt periplazmájába ürítő pHTS115 expressziós plazmid előállítására szolgáló eljárást a 4. ábrán szemléltetjük.

A (2) pontban leírt módon kapott Aval-Sall-fragmenst egy kémiai szintetizált,

5'-GATCCATGTCATCTTCTCGAACC

3'-GTACAGTAGAAGAGCTTGGGGCT

képletű oligodezoxiribonukleotiddal kapcsoljuk.

Az összekapcsolt DNS-fragmens BamHI restrikciós endonukleázzal emésztve mindkét végén BamHI kóhéziós terminálissal rendelkező DNS fragmenst – továbbiakban HTNF-Tet^r-BamHI-fragmensnek nevezzük – állítunk elő.

Fentiekől függetlenül, egy *phoS*-gént tartalmazó pSN5182 plazmidot [Morita, T. és munkatársai: Eur. J. Biochem., 130, 427 (1983)] HpaI és EcoRI endonukleázokkal emésztve olyan, kb. 4000 bázispárt tartalmazó, *phoS* promotor régiót és Shine-Dalgarno-szekvenciát magában foglaló DNS-fragmenst állítunk elő, amely a szignál-peptidet és a foszfát-kötő protein N-terminális szakaszát kódoló DNS-szekvenciát, továbbá a tetraciklin-rezisztencia gént tartalmazza. A fenti DNS-fragmenst a továbbiakban HpaI-EcoRI-

fragmensnek nevezzük. A HpaI-EcoRI-fragmenst egy kémiai szinterizált,

5'-CCCGGATCCGGG

3'-GGGCCTAGGCCC

szekvenciájú oligodezoxiribonukleotiddal kapcsoljuk össze.

Ezután a kapcsolt DNS-fragmenst BamHI restrikciós endonukleázzal emésztjük. A kapott, kb. 3600 bázispárból álló DNS-fragmenst, amely mindkét végén BamHI kohéziós terminálissal rendelkezik, a továbbiakban *phoS* promotor-BamHI•Tet^r fragmensnek nevezzük.

A HTNF•Tet^r•BamHI-fragmenst a *phoS* promotor-BamHI•Tet^r-fragmenssel összekapcsolva foszfát-kötő proteinnel fuzionált humán TNF polipeptid termelésére képes expressziós plazmidot kapunk, melyet pHTS115-nek nevezzük. A fenti expressziós plazmidot a fent ismertetett eljárással *E. coli* HB101 sejtekbe visszük be.

A transzformánsok egyikét (HB101/pHTS115) 5 ml 0,64 mmól/l kálium-dihidrogén-foszfáttal kiegészített TG-táptalajban (összetétel: 120 mmól/l koncentrációjú, 0,2% glükózt, 80 mmól/l nátrium-kloridot, 20 mmól/l kálium-kloridot, 20 mmól/l ammónium-kloridot, 3 mmól/l nátrium-szulfátot, 1 mmól/l magnézium-kloridot, 0,2 mmól/l kalcium-kloridot, 200 mmól/l ferri-kloridot, 20 mg/l leucint, 20 mg/l prolint és 10 mg/l B₁-vitamint tartalmazó Tris-HCl-puffer, pH 7,4), 37 °C-on, rázatás közben 20 órán át tenyésztjük. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük, 2 ml 0,064 mmól/l kálium-dihidrogén-foszfáttal kiegészített TG-táptalajban újraszuszpendáljuk és 37 °C-on 6 órán át tenyésztjük. A sejteket lecentrifugáljuk, 1 ml, 30 mmól/l nátrium-kloridot tartalmazó 10 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,2) mossuk, majd 0,2 ml 33 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferben (pH 7,2) újraszuszpendáljuk, és azonos térfogatú, 0,1 mmól/l EDTA-t és 40% szacharózt tartalmazó 33 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,2) elegyítjük. Az elegyet 37 °C-on 10 percen át inkubáljuk, majd a sejteket összegyűjtjük, 0,4 ml hideg, 0,5 mmól/l koncentrációjú magnézium-klorid-oldatban újraszuszpendáljuk és jeles vizet fürdőn 10 percen át állni hagyjuk, a szuszpenziót időnként rázogattuk. A sejtörmelékét centrifugálással eltávolítva tiszta extraktumot kapunk, melyet a továbbiakban periplazmás extraktumnak nevezzük.

A periplazmás extraktum citotoxikus aktivitása $1,34 \cdot 10^5$ egység (L-929)/ml.

A citotoxikus aktivitással rendelkező polipeptid móltömege nátrium-dodecilsulfát (SDS)-poliakrilamid gélben (12,5%) elektroforézissel meghatározva 19000, ami azt jelenti, hogy az előállított polipeptid egy fuzionált protein.

(4) Expresszió *phoS* promotor szabályozás mellett

A szignál-peptiddel és a foszfát-kötő protein N-terminális részével fuzionált humán TNF polipeptid, továbbá a prekursorának egy részét is tartalmazó biológiai aktív humán TNF polipeptid termelésére képes,

és azt a gazdasejt periplazmájába ürítő pHTS37 expressziós plazmid előállítását az 5. ábrával szemléltetjük.

A pHTNF13 rekombináns plazmid DNS-t PstI restrikciós endonukleázzal emésztve kivágjuk a kb. 1200 bázispárból álló, humán TNF cDNS-t magában foglaló DNS-fragmenseket. A kapott DNS-fragmenst BbeI restrikciós endonukleázzal tovább emésztve egy kb. 900 bázispárból álló DNS-fragmenst kapunk, melyet a továbbiakban BbeI-PstI-fragmensnek nevezzük.

6 mikrogramm BbeI-PstI-fragmenst 80 mikroliter, 12 mmól/l kalcium-kloridot, 12 mmól/l magnézium-kloridot, 0,2 mmól/l nátrium-kloridot, 1 mmól/l EDTA-t és 0,02 egység Bal 31 exonukleáz tartalmazó 20 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferben (pH 8,0) oldunk, és 30 °C-on 30 percen át inkubálva a DNS-fragmens mindkét végéről közel 50–150 bázispárt lehasítunk. A fragmensek végeit ezután 37 °C-on 60 percen át 10 egység *E. coli* DNS-polimeráz I-gyel (nagy fragmens) inkubálva 0,1 mmól/l dTGP, 0,1 mmól/l dGTP, 0,1 mmól/l dATP, 0,1 mmól/l dCTP, és 0,1 mmól/l dTTP, továbbá 50 mikrogramm/ml marha szérumalbumin jelenlétében kijavítjuk. A javított DNS-fragmenst EcoRI restrikciós endonukleázzal emésztjük, és a kapott, közel 750 bázispárt tartalmazó DNS-fragmenst, amely tompa és egy EcoRI kohéziós véggel rendelkezik – továbbiakban Bal 31-EcoRI-fragmensnek nevezzük –, izoláljuk, a hozam kb. 3 mikrogramm.

A Bal 31-EcoRI-fragmenst a közel 4000 bázispárból álló HpaI-EcoRI-fragmenssel összekapcsolva – az utóbbit a (3) pontban pSN5182-ből állítottunk elő – olyan expressziós plazmidot kapunk, amely *phoS* promotor régiót, Shine-Dalgarno-szekvenciát, a szignál-peptidet és egy foszfát-kötő protein N-terminális részét kódoló DNS-szekvenciát, és a biológiai aktív humán TNF polipeptidet és prekursor polipeptidjének egy részét kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz.

Az expressziós plazmidot pHTS37-nek nevezzük, és *E. coli* HB101 sejtekbe visszük be, a kapott transzformánst HB101/pHTS37-nek nevezzük. A HB101/pHTS37 transzformáns tenyésztését és a periplazmás extraktum előállítását a (3) pontban leírtak szerint végezzük.

A kapott periplazmás extraktum citotoxikus aktivitása $4,93 \cdot 10^5$ egység (L-929)/ml.

Az extraktumot SDS-poliakrilamid (12,5%) gél-elektroforézisnek vetjük alá. Az elektroforézist 35 V feszültség mellett 12 órán át folytatjuk, 0,1% SDS-t tartalmazó Tris-glicin-puffert (pH 8,3) használva. A proteint Coomassie brilliant blue-val festjük meg. A 22000, illetve 16500 móltömegnek megfelelő helyzetben két olyan protein-sáv található, amely az *E. coli* HB101 extraktumában nem észlelhető. Egy másik gélelemez 2 mm-es csíkokra vágunk, és minden egyes gélszeletet 1 ml, 1% magzati marhaszérumot tartalmazó Eagle-féle minimáltáptalajban egy éjszakán át 4 °C-on rázatunk, a protein eluálása céljából. Minden egyes eluátum citotoxikus aktivitását mérjük, célsejtként egér L-929 sejteket használunk. Vizsgálati eredményeink szerint a Coomassie brilliant blue-val festett le-

mezen a 16500 móltömegnek megfelelő helyen lévő protein erős citotoxikus aktivitással rendelkezik.

A pHTS37 expressziós plazmid szerkezete alapján feltételezhető, hogy a transzformált sejtekben termelt humán TNF polipeptid egy fuzionált protein, amely foszfát-kötő protein egy részéből és prekursorának egy részét tartalmazó humán TNF polipeptidből áll. A fuzionált protein számított molekulatömege közel 23 000. A biológiailag aktív humán TNF polipeptid molekulatömege viszont 17 097. A fenti vizsgálati eredmény szerint a kapott fuzionált proteint a gazdasejtben korlátozott hidrolizissal biológiailag aktív humán TNF polipeptiddé alakíthatjuk, valószínűleg egy specifikus helyen (Arg-Ser) való hasítással, ahol a biológiailag aktív humán TNF polipeptid a prekursor-részhez kapcsolódik.

Ha a periplazmás extraktumot 5 mikrogramm/ml tripszinnel (marha pankréaszból előállított, Sigma Chemical Co.) 37 °C-on 1 órán át inkubáljuk, és a reakcióelegyet SDS-poli-akrilamid gél- elektroforézisnek vetjük alá a fenti körülmények között, a 22 000 molekulatömegnek megfelelő helyzetben korábban kimutatott protein-sáv – amely valószínűleg a fuzionált protein sávja – nem észlelhető, a tripszines emésztés következtében eltűnik.

3. példa

Módosított humán TNF polipeptid előállítása

A biológiailag aktív humán TNF polipeptid N-terminális végéről négy aminosav törlésével kapott polipeptidet kódoló DNS-t hordozó pHTRD4 expressziós plazmidot lényegében a 2-(2). példában a pHTR91 expressziós plazmid előállítására szolgáló eljárással állítjuk elő, azzal az eltéréssel, hogy az I. adapter helyett az

5'-CGATATGACC
3'-TATACTGGGGCT

képletű szintetikus adaptert használjuk.

A fenti adapter használata esetén az iniciációs kodont (ATG) követő bázisszekvencia egy olyan 151 aminosavból álló polipeptidszekvenciát kódol, amely a biológiailag aktív humán TNF polipeptid N-terminálisán lévő négy aminosav (Ser-Ser-Ser-Arg) törlésével keletkezik.

A fenti eljárással előállított pHTRD4 expressziós plazmidot E. coli HB101 sejtekbe visszük be, és a kapott transzformánst egy éjszakán át 37 °C-on, módosított M-9 táptalajban tenyésztjük. A tenyészet 0,05 ml-ét 5 ml azonos táptalajba oltjuk, és 37 °C-on 1 órán át tenyésztjük. Ezután 20 mikrogramm/ml végkoncentrációban 3-β-indolakriltsavat adunk a tenyészethez, és a tenyésztést egy éjszakán át tovább folytatjuk. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük, és a 2-(1). példában leírtak szerint kezelve tiszta lizátumot állítunk elő belőlük.

A lizátum citotoxikus aktivitása $1,1 \cdot 10^5$ egység (L-929)/ml.

4. példa

Humán TNF prekursor polipeptid előállítása Escherichia coli-ban

A humán TNF prekursor polipeptidet kódoló cDNS-t hordozó pHTRP3 expressziós plazmidot a következők szerint állítjuk elő.

A pHT113 rekombináns plazmidból kettős, PstI és HindIII restrikciós endonukleázokkal végzett emésztéssel nyert klónozott cDNS-t HgiAI restrikciós endonukleázal részlegesen tovább emésztve olyan – kb. 820 bázispárból álló – DNS-fragmenst kapunk, amely a prekursor polipeptid nagy részét kódoló bázisszekvenciát magában foglalja. A kapott DNS-fragmenst kémiai szintetizált,

5'-CGATATGAGCA
3'-TATAC

képletű oligodezoxiribonukleotiddal kapcsoljuk össze. Az összekapcsolással nyert DNS-fragmenst a továbbiakban Pre-TNF-fragmensnek nevezzük.

Fentiekől függetlenül, a pDR720 plazmidból EcoRI és HpaI restrikciós endonukleázokkal végzett emésztéssel egy, a trp promotor régió egy részét tartalmazó DNS-fragmenst vágunk ki, és a kapott DNS-fragmenst kémiai szintetizált,

5'-AACTAGTACGCAAGTTCACGTAAAAAG
GGTAAT

3'-TTGATCATGCGTTCAAGTGCATTTTCCC
ATTAGC

képletű adapterrel kapcsoljuk össze.

A kapott DNS-fragmenst Pre-TNF-fragmenssel kapcsoljuk össze, és az összekapcsolt DNS-fragmenst egy, a pBR322 plazmidból EcoRI és HindIII restrikciós endonukleázos emésztéssel izolált, ampicillin-rezisztencia gént tartalmazó, kb. 4300 bázispárból álló DNS-fragmenssel kapcsoljuk össze.

A fenti eljárással előállított pHTRP3 expressziós plazmidot E. coli HB101 sejtekbe visszük be, és a transzformált sejteket egy éjszakán át 37 °C-on, módosított M-9 tápközegben tenyésztjük. A tenyészet 0,05 ml-ét 5 ml azonos táptalajba oltjuk, és a sejteket 1 órán át 37 °C-on tenyésztjük. A tenyészethez ezután 20 mikrogramm/ml végkoncentrációban 3-β-indolakriltsavat adunk, és a tenyésztést egy éjszakán át tovább folytatjuk. A sejteket centrifugálással összegyűjtjük, és a 2-(1). példában leírtak szerint kezelve tiszta lizátumot állítunk elő belőlük.

A lizátum citotoxikus aktivitása $1,8 \cdot 10^4$ egység (L-929)/ml.

5. példa

Humán TNF polipeptid előállítása és tisztítása

(1) Polipeptid előállítása Escherichia coli-ban

A humán TNF polipeptid előállítására a 2-(2). példa szerint előállított HB101/pHTR91 transzformánst használjuk. A transzformánst egy éjszakán át 12,5 mikrogramm/ml tetraciklinnel kiegészített LB-tápközegben 37 °C-on tenyésztjük. A tenyészetet 10 ml, a 2-(2). példában is használt, módosított M-9 tápközegbe oltjuk, és 37 °C-on 1 órán át tenyésztjük. A tenyészethez 20 mikrogramm/ml végkoncentrációban 3-β-indolakriltsavat adunk, és a tenyésztést 4 órán át tovább folytatjuk. A sejteket a 2-(1). példában ismertetett módon összegyűjtjük, és tiszta lizátumot állítunk elő belőlük.

A kapott lizátumot használjuk fel a tisztított humán TNF polipeptid előállítására.

(2) Humán TNF polipeptid tisztítása

A humán TNF polipeptidet az (1) pontban leírtak szerint kapott lizátumból a következők szerint tisztítjuk. 5•20 cm-es, előzőleg 20 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,8) ekvilibrált DEAE-Sepharse CL-6B-vel (Pharmacia) töltött oszlopra 1030 ml lizátumot viszünk fel. Az oszlopot 3 liter azonos pufferrel mossuk, majd 133 ml/óra átfolyási sebesség mellett a fenti pufferben 0–0,3 mól/l lineáris koncentrációgradiensű nátrium- kloriddal eluáljuk. Az eluátumból 10 ml-es frakciókat gyűjtünk. A citotoxikus aktivitással rendelkező frakciókat összegyűjtjük és félretesszük.

A fenti lépésben a citotoxikus aktivitás 53%-át nyerjük vissza, a fajlagos aktivitás közel 9-szeresére növekedik.

A félretett frakciókat sómentesítjük, és ultraszűréssel [Diaflo, YM10 membrán (Amicon)] eredeti térfogatának 10-ed részére koncentrálnak.

A koncentrátumot preparatív méretű izoelektromos fókuszáló gél- elektroforézisnek vetjük alá. A koncentrátum egy alikvot mennyiségét 0,2•10•10 cm-es poliakrilamid gélelemzre visszük, és Immobililine-nel (LKB) pH 5,6–pH 6,1 értékek közé eső pH-gradienszt biztosítunk. Az elektroforézist 2400 V mellett, 15 °C-on 16 órán át folytatjuk. A gél 10 mm széles csíkokra vágjuk, és a proteint 20 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,8) eluáljuk. A fenti műveletet megismételjük. A citotoxikus aktivitással rendelkező eluátumokat összegyűjtjük, és ultraszűréssel koncentrálnak, a fenti módon. Végül a koncentrátumot 0,7•25 cm-es, Bio-gel P-6 (BIO-RAD) töltetű oszlopra visszük, és sómentesítjük.

A sómentesített végtermék citotoxikus aktivitása SDS- poliakrilamid gél-elektroforézis vizsgálat alapján homogén, és azt a [III] fejezetben említettek szerint mint tisztított humán TNF polipeptidet vizsgáltuk.

6. példa

Liofilizált humán TNF polipeptid előállítása

Az 5. példa szerint előállított tisztított humán TNF polipeptid oldatot használjuk a liofilizált humán TNF polipeptid előállítására.

10 ml 2,2•10⁷ egység (LM)/ml citotoxikus aktivitással rendelkező tisztított humán TNF polipeptid oldatot 0,1 térfogatnyi 0,8%-os, 10% humán szérumalbumint és 20% D-mannitot tartalmazó nátrium-klorid-oldattal elegyítünk. Az oldat pH-ját 6,8-ra állítjuk, majd a kapott oldatot Microflow membránon (Flow Labs., pórusméret: 0,2 mikron) átszűrve sterilizáljuk. 5 ml steril oldatot üvegcsőbe töltünk, és liofilizáljuk. Minden egyes cső 10⁷ egység (LM) tisztított humán TNF polipeptidet tartalmaz.

1. referenciapélda

Nyúl TNF cDNS előállítása

(1) TNF mRNS előállítása nyúl alveolusz makrofágokból

Közel 2,5 kg-os nyulaknak intravénásan 100 mg/nyúl dózisban elölt, száraz *Propionibacterium acnes* sejteket injektálunk, majd az állatokat 8 nap múlva leöljük. A tüdőt az állat légcsővébe illesztett cső segítségével foszfáttal pufferolt sóoldattal többször átmoszuk, és az alveoláris makrofágokat összegyűjtjük. 12 nyulból körülbelül 3•10⁹ alveoláris makrofágot kapunk.

Az alveoláris makrofágokat 10% magzati marhaszérumot tartalmazó RPMI-táptalajban szuszpendáljuk, és 2•10⁷ sejt/csésze sejtkoncentrációt biztosítva 8 cm átmérőjű Petri-csészére oltjuk. A sejteket 5% szén-dioxidot tartalmazó, telített páratartalmú légtérben 37 °C-on előtenyésztjük. 1 órás előtenyésztés után 10 mikrogramm/ml végkoncentrációban endotoxint (*E. coli*ból származó lipopoliszacharidot), 10 ng/ml végkoncentrációban TPA-t (forbol-12- mirisztát-13-acetátot) és 1 mikrogramm/ml végkoncentrációban cikloheximidet adunk a tenyészetbe. A tenyésztést 4–4,5 órán át (azaz összesen 5–5,5 órán keresztül) folytatjuk, a táptalajt leszívjuk, és a csészéhez tapadt makrofágokat 0,6% nátrium- lauroil-szarkozinátot és 6 mmól/l nátrium-citrátot tartalmazó 5 mól/l koncentrációjú guanidil-tiocianát-oldatban homogenizáljuk. A homogenizátumot 0,1 mól/l EDTA-t tartalmazó, 5,7 mól/l koncentrációjú cézium-klorid-oldatra visszük, és ultracentrifugában (Hitachi Koki, RPS27-2 rotor) 26 500 fordulat/perc sebességgel 20 órán át centrifugáljuk. Az össz-RNS- frakciót szemcsés formában kapjuk. A szemcséket kis mennyiségű, 0,35 mól/l nátrium-kloridot, 20 mmól/l Tris-HCl-puffert (pH 7,4) és 20 mmól/l EDTA-t tartalmazó, 7 mól/l koncentrációjú karbamid-oldatban oldjuk, majd etanolból kicsapva visszanyerjük. 12 nyulból 5,2 mg össz-RNS-t kapunk.

A össz-RNS-frakciót 2 ml, az 1-(1). példában használt TE-oldatban oldjuk, és az oldatot 65 °C-on 5 percen át melegítjük. 0,5 mól/l koncentrációban nátrium-klorid-oldatot adunk hozzá, és az oldatot előzőleg 0,5 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó TE-oldattal ekvilibrált oligo(dT)-cellulóz-oszlopra visszük. Az oszlopról TE- oldattal eluáljuk a poli(A)-mRNS-t, a hozam 314 mikrogramm. 200 mikrogramm kapott poli(A)-mRNS-t 6 mmól/l karbamid jelenlétében 1% gélkoncentrációt alkalmazva, pH 4 értéken agaróz gél- elektroforézisnek vetünk alá, és a molekulaméretnek megfelelően 7 frakcióra választjuk szét. A poli(A)mRNS-t minden egyes gélfrakcióból úgy nyerjük ki, hogy a gél 70 °C-on 10 percen át melegítve megolvasztjuk, fenollal, majd kloroformmal extraháljuk, és etanolból kicsapjuk. Az egyes frakciókból visszanyert poli(A)mRNS nyúl TNF mRNS tartalmát *Xenopus laevis* oocitáit használva mRNS transzlációs vizsgálattal határozzuk meg.

A nyúl TNF mRNS-t nagyobb koncentrációban az 1600–2700 bázispárnak megfelelő méretű frakcióból nyerjük vissza, melyet a továbbiakban nyúl TNF mRNS-ben feldúsult frakciónak nevezünk.

A nyúl TNF mRNS-ben feldúsult frakciót az alábbi kísérletben használjuk fel.

(2) cDNS szintézise

A cDNS-t az alábbiak szerint szintetizáljuk. 4 mikrogramm TNF mRNS-ben feldúsult frakciót 100 mikroliter, 10 mmól/l magnézium-kloridot, 70 mmól/l kálium-kloridot, 1 mmól/l ditiotreitolt, 0,5 mmól/l dTTP-t, 0,5 mmól/l dATP-t, 0,5 mmól/l dGTP-t, 0,5 mmól/l, ³²P-ral jelzett dCTP-t (specifikus aktivitása 4,4•10⁶ beütés/nmól), 3 mikrogramm oligo(dT)₁₂₋₁₈-at és 80 egység madár mieloblaztozis vírusból származó reverz transzkriptázt tartalmazó, 50 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferben (pH 8,3) oldunk, és 43 °C-on 90 percen át inkubáljuk. A reakciót ezután EDTA hozzáadásával leállítjuk. A kapott cDNS-mRNS hibridet 1:1 arányú fenol- kloroform eleggyel extraháljuk, és etanolból kicsapva a vizes fázisból visszanyerjük. A mRNS templátot 65–70 °C-on végzett lúgos kezeléssel eltávolítjuk. A szintetizált sscDNS-t etanolos kicsapással visszanyerjük.

Az sscDNS csapadékot 40 mikroliter, 0,5 mmól/l dATP-t, 0,5 mmól/l dTTP-t, 0,5 mmól/l dCTP-t, 0,5 mmól/l dGTP-t, 5 mmól/l magnézium- kloridot, 70 mmól/l kálium-kloridot, 1,5 mmól/l 2-merkaptó- etanol és 8 egység E. coli DNS-polimeráz I-et (nagy fragmens) tartalmazó, 0,1 mól/l koncentrációjú Hepes-pufferben (pH 6,9) oldjuk, és 15 °C-on 20 órán át inkubálva szintetizáljuk a dscDNS-t. A reakciót nátrium-dodecil-szulfát hozzáadásával leállítjuk. A dscDNS-t fenol-kloroform eleggyel extraháljuk, és etanolból kicsapva visszanyerjük.

A kapott dscDNS-t 100 mikroliter, 1 mmól/l cink-szulfátot, 200 mmól/l nátrium-kloridot, 0,5% glicerint és 0,5 egység S1 nukleázt tartalmazó, 50 mmól/l koncentrációjú nátrium-acetát-pufferben (pH 4,5) oldjuk, és 37 °C-on 20 percen át inkubálva elhasítjuk a hajtó-szerkezetet. A reakciót EDTA hozzáadásával leállítjuk. A reakcióelegyet fenol-kloroform eleggyel, majd dietil-éterrel extraháljuk. A dscDNS-t etanolból kicsapva nyerjük vissza.

(3) Oligo(dC)-végű cDNS előállítása

A fenti (2) pontban kapott dscDNS-t 100 mikroliter, 1 mmól/l kobalt-kloridot, 0,1 mmól/l ditiotreitolt, 0,2 mikrogramm poli(A)-t, 0,1 mmól/l ³H-dCTP-t (specifikus aktivitása 5400 beütés/pmól) és 10 egység terminális dezoxinukleotidil- transzferázt tartalmazó, 130 mmól/l nátrium-kakodilát-30 mmól/l Tris-HCl pufferben (pH 6,8) oldjuk, és 37 °C-on 20 perces inkubálással a dscDNS 3'-végéhez hozzákapcsoljuk az oligo(dC)- végcsoportot.

A reakciót EDTA hozzáadásával leállítjuk. A reakcióelegyet fenol- kloroform eleggyel, majd dietil-éterrel extraháljuk, és az oligo(dC)-végű dscDNS-t etanolból végzett kicsapással visszanyerjük. Az oligo(dC)-végű dscDNS-t 0,2 mikrogramm/ml végkoncentrációban 1 mmól/l EDTA-t és 100 mmól/l nátrium-kloridot tartalmazó, 10 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferben (pH 7,4) oldjuk.

(4) Oligo(dG)-végű pBR322 plazmid DNS előállítása

10 mikrogramm pBR322-t 100 mikroliter, 10 mmól/l magnézium- kloridot, 50 mmól/l ammónium-szulfátot és 10 mikrogramm marha szérumalbumint tartalmazó, 20 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl- pufferben (Ph 7,4) oldunk, és hozzáadunk 15 egység PstI restrikciós endonukleázt. Az elegyet 37 °C-on 1 órán át inkubáljuk. A reakció leállítását után a reakcióelegyet fenol- kloroform eleggyel extraháljuk, és a kapott DNS-t etanolból kicsapva a vizes fázisból visszanyerjük. A kapott DNS-t 200 mikroliter, a dscDNS oligo(dC)-véggel való kapcsolására használt pufferével azonos összetételű, de 80 egység terminális dezoxinukleotidil-transzferázt és ³H-dCTP helyett ³H- dGTP-t tartalmazó pufferoldatban oldjuk, és 37 °C-on 20 percen át inkubálva kialakítjuk a kb. 10–15 dG-ből álló végcsoportot. A reakcióelegyet fenol-kloroform eleggyel extraháljuk, az oligo(dG)-végű pBR322 plazmid DNS-t etanolból végzett kicsapás után a vizes fázisból visszanyerjük. A kapott, oligo(dG)- végcsoportot tartalmazó plazmid DNS-t az oligo(dC)-végű dscDNS oldására használt pufferével azonos összetételű pufferben oldjuk, 2 mikrogramm/ml végkoncentrációban.

(5) Rekombináns plazmid előállítása

50 mikroliter oligo(dC)-végű cDNS-oldatot 50 mikroliter oligo(dG)-végű pBR322 DNS-oldattal elegyítünk, és az elegyet 65 °C-on 10 percen át, 57 °C-on 120 percen át, 45 °C-on 60 percen át, 35 °C-on 60 percen át végül szobahőmérsékleten 60 percen át inkubálva hőkezeljük, és kialakítjuk a rekombináns plazmidokat.

(6) Transzformánsok kiválasztása

A fenti (5) pontban kapott rekombináns plazmiddal E. coli χ 1776 sejteket transzformálunk.

Közelebbről, az E. coli χ 1776-t 37 °C-on 20 ml, 100 mikrogramm/ml diamino-pimelinsavval és 40 mikrogramm/ml timidinnel kiegészített L-táptalajban tenyésztjük, míg a tenyészet zavarossága 600 nm-en eléri a 0,5 értéket. A sejteket 0 °C-on centrifugálással összegyűjtjük, és 50 mmól/l kalcium-kloridot tartalmazó, 10 mmól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,3) mossuk. A sejteket 2 ml fenti összetételű pufferben újrasszuszpendáljuk, és 0 °C-on 5 percen át állni hagyjuk. A szuszpenzió 0,2 ml-éhez 0,1 ml fent kapott rekombináns plazmidoldatot adunk. Az elegyet 0 °C-on 15 percen át állni hagyjuk, majd 2 percen át 42 °C-on tartjuk. Ezután hozzáadunk 0,5 ml fenti összetételű kiegészített L- táptalajt, és a sejteket rázatás közben 1 órán át tenyésztjük. A tenyészetből vett alikvot mintát 15 mikrogramm/ml tetraciklint tartalmazó L-tápközeges agarlemezre rétegezzük, és 37 °C-on 12 órán át tenyésztjük. A tetraciklinre rezisztens transzformánsokat kiválasztjuk, és ezeket használjuk cDNS génállományként.

(7) Hibridizációs vizsgálat

A telep-hibridizációt Hanahan és Meselson módszerével végezzük, mintaként ³²P-jelzett cDNS-t használ-

lunk, és kiválasztjuk azokat a transzformánsokat, amelyek nyúl TNF-et kódoló cDNS-t tartalmaznak. A pozitív és negatív indukciós, ^{32}P -ral jelzett sscDNS mintákat a fenti (2) pontban leírtak szerint szintetizáljuk, az (1) pontban leírt módon pozitív és negatív indukciós alveoláris makrofágokból nyert mRNS-eket használva, azzal az eltéréssel, hogy nagy fajlagos aktivitású ^{32}P -dCTP-t használunk. A fenti vizsgálat során kiválasztjuk azokat a transzformáns-telepeket, amelyek olyan rekombináns plazmidot fogadtak be, amely a pozitív indukciós mintával erősen hibridizál, de a negatív indukciós mintával nem hibridizál. A közel 20 000 telep közül 50 ilyen telepet szelektáltunk.

Az 50 szelektált telep közül 20 telepet ezután mRNS hibridizációs-transzlációs vizsgálatnak vetünk alá, T. Maniatis és munkatársai [(szerkesztő), „Molecular Cloning”, 329 (1980), Cold Spring Harbor Lab.] módszere szerint. Az egyes transzformánsokból extraháljuk a plazmid DNS-t, és hődenaturálás után nitrocellulóz szűrőkre visszük. A szűrőre visszük az (1) pontban leírt módon előállított nyúl TNF mRNS-t tartalmazó poli(A)mRNS-frakciót, és 50 °C-on 3 órán át inkubálva végrehajtjuk a hibridizálást. A hibridizált mRNS-t visszanyerjük, és oocitákba injektáljuk annak kimutatására, hogy a visszanyert mRNS valóban nyúl TNF mRNS-e. A vizsgálat eredményeként 3 olyan telepet szelektáltunk, amelyekben olyan cDNS-t tartalmazó plazmid volt, amely erősen hibridizált a nyúl TNF mRNS-sel. A legnagyobb méretű cDNS-t (kb. 750 bázispárt) tartalmazó plazmidból DdeI restrikciós endonukleázos emésztéssel kapott cDNS-fragmenseket használjuk mintaként a további vizsgálatban. A fenti DNS-fragmenseket ^{32}P -ral jelezzük. A fenti mintákat használva a (6) pontban kapott cDNS génállományt telep-hibridizációs vizsgálatnak vetjük alá, és kiválasztjuk azokat a telepeket, amelyek a jelzett mintákkal erő-

sen hibridizálódó cDNS-eket tartalmazó plazmiddal rendelkeznek. A fenti vizsgálatban a cDNS génállományt tartalmazó 60 000 telep közül 98 telep bizonyult megfelelőnek. A rekombináns plazmid DNS-t izoláljuk és belőlük PstI restrikciós endonukleázos emésztéssel kivágjuk a betoldott cDNS-eket, és poliakrilamid gél-elektroforézissel meghatározzuk azok méretét. 17 olyan transzformáns klónt szelektálunk, amelyben legalább 1000 bázispárból álló betoldott cDNS van. A legnagyobb méretű cDNS-t tartalmazó transzformánsból (transzformáns száma: $\chi 1776/\text{pRTNF802}$; plazmid száma: pRTNF802) izoláljuk a klónozott cDNS-t, és bázisszekvenciáját az alábbi módszerrel meghatározzuk.

(8) Klónozott cDNS bázisszekvenciájának meghatározása

A fenti (7) pontban leírt módon szelektált $\chi 1776/\text{pRTNF802}$ transzformánst diamino-pimelinsavval és timidinnel kiegészített L-táptalajban tenyésztjük. A sejteket Wilkie és munkatársai módszere szerint kezelve plazmid DNS-t kapunk. A plazmid DNS-t PstI restrikciós endonukleázzal emésztjük, és tisztítjuk, a klónozott cDNS előállítás céljából. A klónozott cDNS-fragmenst különféle restrikciós endonukleázokkal tovább emésztjük, és a megfelelő, restrikciós endonukleázzal hasított fragmensek bázisszekvenciáját Maxam-Gilbert módszerrel meghatározzuk.

A fenti módon meghatározott bázisszekvenciát a 9. táblázatban ismertetjük. A 277–738. bázisokból álló bázisszekvencia kódolja a 2. referenciapélda szerint nyúlplazmából tisztított TNF N-terminális és C-terminális aminosavszekvenciájának megfelelő biológiailag aktív nyúl TNF-et. A 34–276. bázisok alkotják azt a bázisszekvenciát, amely feltehetőleg a prekurzor nyúl TNF felépítéséhez szükséges polipeptidet kódolja.

9. táblázat

10	20	30
GGGGGGGGGGGGGGGGGCCCTCTGGAGAGAGC		
40	50	60
GCCATGAGCACTGAGAGTAT GATCCGGGAC		
MetSerThrGluSerMetIleArgAsp		
70	80	90
GTCGAGCTGGCGGAGGGGCC GCTCCCCAAG		
ValGluLeuAlaGluGlyProLeuProLys		
100	110	120
AAGGCAGGGG GGCCCCAGGG CTCCAAGCGC		
LysAlaGlyGlyProGlnGlySerLysArg		
130	140	150
TGCCTCTGCC TCAGCCTCTTCTCTTTCCTG		
CysLeuCysLeuSerLeuPheSerPheLeu		
160	170	180
CTCGTGGCTGGAGCCACCACTCTTCTGC		
LeuValAlaGlyAlaThrThrLeuPheCys		
190	200	210
CTGCTGCACTTCAGGGTGATCGGCCCTCAG		
LeuLeuHisPheArgValIleGlyProGln		
220	230	240
GAGGAAGAGCAGTCCCCAACCACTCCAT		
GluGluGluGlnSerProAsnAsnLeuHis		

250 260 270
 CTAGTCAACCCTGTGGCCCAGATGGTCACC
 Leu Val Asn Pro Val Ala Gln Met Val Thr
 280 290 300
 CTCAGATCAGCTTCTCGGGCCCTGAGTGAC
 Leu Arg Ser Ala Ser Arg Ala Leu Ser Asp
 310 320 330
 AAGCCTCTAGCCCACGTAGTAGCAAACCCG
 Lys Pro Leu Ala His Val Val Ala Asn Pro
 340 350 360
 CAAGTGGAGGGCCAGCTCCAGTGGCTGAGC
 Gln Val Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Ser
 370 380 390
 CAGCGTGCGAACGCCCTGCTGGCCAACGGC
 Gly Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn Gly
 400 410 420
 ATGAAGCTCACGGACAACCAGCTGGTGGTG
 Met Lys Leu Thr Asp Asn Gln Leu Val Val
 430 440 450
 CCGGCCGACGGGCTGTACCTCATCTACTCC
 Pro Ala Asp Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser
 460 470 480
 CAGGTTCTCTTCAGCGGTCAAGGCTGCCGC
 Gln Val Leu Phe Ser Gly Gln Gly Cys Arg
 490 500 510
 TCCTACGTGCTCCTCACTCACA CTGT CAGC
 Ser Tyr Val Leu Leu Thr His Thr Val Ser
 520 530 540
 CGCTTCGCCGTCTCCTACCCGAACAAGGTC
 Arg Phe Ala Val Ser Tyr Pro Asn Lys Val
 550 560 570
 AACCTCCTCTCTGCCATCAAGAGCCCCTGC
 Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser Pro Cys
 580 590 600
 CACCGGGAGACCCCGAGGAGGCTGAGCCC
 His Arg Glu Thr Pro Glu Glu Ala Glu Pro
 610 620 630
 ATGGCCTGGTACGAGCCCATCTACCTGGGC
 Met Ala Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly
 640 650 660
 GGCGTCTTCCAGTTGGAGAAGGGTGACCGG
 Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly Asp Arg
 670 680 690
 CTCAGCACCGAGGTCAACCAGCCTGAGTAC
 Leu Ser Thr Glu Val Asn Gln Pro Glu Tyr
 730 740 750
 TTTGGGATCATTGCCCTGTGAGGGGACTGA
 Phe Gly Ile Ile Ala Leu
 760 770 780
 CCACCACTCCTCCCCCTCTCCACCCCAGC
 790 800
 CCCCTCACTCTGGGCGCCCTCAG

2. referenciapélida

Nyúl plazma TNF izolálása és tisztítása

2,5–3,0 kg-os nyulakba intravénásan 50 mg előlt, száraz Propionibacterium acnes sejtet injektálunk. Nyolc nap múlva a nyulaknak intravénásan 100 mikrogramm endotoxint (E. coliból származó lipopoliszacharidot) injektálunk. Két óra múlva minden nyúltól

55

vért veszünk, szív-punkcióval. A vérhez 100 egység/100 ml koncentrációban nátrium-heparint keverünk, majd 5000 fordulat/perc sebességgel, hűtés közben 30 percen át centrifugálva eltávolítjuk a véresejteket és az oldhatatlan anyagokat. 400 nyútból 24 l plazmát nyerünk.

60

A 24 l plazmához 24 g EDTA-t és 240 g celite-t adunk, és az elegyet 1 órán át keverjük, majd egymást követően 3 mikron, 1 mikron, végül 0,2 mikron pórusméretű szűrőn szűrjük.

24 l szűrlethez 12 l 0,04 mól/l koncentrációjú Tris-HCl-puffert (pH 7,8) adunk, és az elegyet 27•45 cm-es DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia) oszlopra viszzük, melyet előzőleg 0,1 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó, 0,04 mól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,8) ekvibráltunk. Az oszlopot ezután 75 l, 0,1 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó, 0,04 mól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,8), majd 50 l, 0,15 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó, 0,04 mól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,8) mossuk, és végül 0,18 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó, 0,04 mól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,2) eluáljuk. Az eluátumból 8 l-es frakciókat szedünk, és a citotoxikus aktivitással rendelkező aktív frakciókat összegyűjtjük. Az aktív frakciókat egyesítjük, és azonos térfogatú 0,04 mól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,8) hígítjuk. A hígított oldatot 10•13 cm-es DEAE-Sepharose CL-6B oszlopra viszzük. Az oszlopot 1 liter, 0,1 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó, 0,04 mól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,8) mossuk, majd 5 l, 0,18 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó, 0,04 mól/l koncentrációjú Tris-HCl-pufferrel (pH 7,2) eluáljuk. Az eluátumból 250 ml-es frakciókat szedünk, és a citotoxikus aktivitással rendelkező frakciókat összegyűjtjük és egyesítjük.

Az aktív frakciót 60 °C-on 30 percen át melegítjük, majd gyorsan 4 °C-ra hűtjük. A lehűtött oldatot ultraszűrővel koncentrálnak.

A kapott koncentrátumot 5•80 cm-es Sephacryl S-200 (Pharmacia) oszlopra viszzük, melyet előzőleg 0,1 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó, 0,005 mól/l koncentrációjú foszfát-pufferrel (pH 7,4) ekvibráltunk, és az oszlopot a fentivel azonos összetételű pufferrel eluáljuk. Az eluátumból 40 ml-es frakciókat szedünk, a citotoxikus aktivitással rendelkező frakciókat összegyűjtjük, egyesítjük és ultraszűrővel koncentrálnak.

Az aktív frakciókból géliszűrővel kapott koncentrátumot Zn²⁺-kelát-Sepharose oszlopra viszzük, az alábbi módon. 1,6•20 cm-es oszlopot kelát-Sepharose-zal (imino-dieetsavval fixált gyanta) töltünk meg, melyet J. Porath és munkatársai [Nature, 258, 598 (1975)] módszere szerint állíthatunk elő, majd 120 ml, 1 mg/ml koncentrációjú cink-klorid-oldattal mossuk, végül 0,1 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó, 0,05 mól/l koncentrációjú foszfát-pufferrel (pH 7,4) ekvibráljuk. Ezután az oszlopra viszzük a fenti lépésben kapott koncentrátumot, és azonos összetételű pufferrel eluáljuk. Az oszlopon nem adszorbeálódott frakciókat gyűjtjük. A fenti frakciókban a citotoxikus aktivitást majdnem teljesen visszanyerjük.

A fenti lépésben kapott aktív frakciókat koncentrálnak, és 1,5•90 cm-es Toyopearl HW-55 (Toyo Soda Co., Ltd.) oszlopra viszzük, melyet előzőleg 0,15 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó, 0,005 mól/l koncentrációjú foszfát-pufferrel (pH 7,4) teljesen ekvibráltunk. Az oszlopot azonos összetételű pufferrel eluáljuk, és

az aktív frakciókat egyesítjük. A fenti módon kapott készítményt nevezzük tisztított nyúl plazma TNF-nek.

A tisztított nyúl plazma TNF-et a 3. és 4. referenciapéldákban használjuk fel.

3. referenciapélda

Nyúl plazma TNF N-terminális és C-terminális aminosavszekvenciájának meghatározása

A 2. referenciapélda szerint előállított tisztított nyúl plazma TNF N-terminális és C-terminális aminosavszekvenciáját az alábbiak szerint határozzuk meg.

Az N-terminális aminosavszekvenciát Edman-lebontásos módszerrel határozzuk meg. A kapott feniltiohidantoin-aminosavakat nagynyomású folyadékromatográfiás módszerrel azonosítjuk, Zorbax ODS oszlopot (Du Pont) használva.

A C-terminális aminosavszekvenciát enzimatis módszerrel határozzuk meg, karboxipeptidázokat használva. A tisztított nyúl plazma TNF-et karboxipeptidáz A-val és Y-nal emésztjük, az enzim- szubsztát arány 1:25, illetve 1:1000. A nyúl plazma TNF C-terminálisáról a kettős emésztés következtében felszabadult aminosavakat az emésztés 2–180 perce között megfelelő időközökben mikro-aminosav-analízissal (Shimadzu Seisakusho) határozzuk meg.

Vizsgálataink szerint a nyúl plazma TNF N-terminális és C-terminális aminosavszekvenciája a következő:

N-terminális: Ser-Ala-Ser-Arg-Ala-....

C-terminális:Val-Tyr-Phe-Gly-Ile-Ile-Ala-Leu.

4. referenciapélda

Nyúl plazma TNF elleni antitest előállítása

A 2. referenciapélda szerint előállított 1,9•10⁵ egység (L-929) tisztított nyúl plazma TNF-et tartalmazó TNF-oldatot azonos térfogatú Freund-féle komplett adjuvánssal emulgeáljuk, és az emulziót több helyen szubkután módon tengerimalacok hátába injektáljuk. Az állatokat 1, 3 és 6 hét múlva azonos módszerrel immunizáljuk. Ezután 8 hét múlva intraperitoneálisan azonos mennyiségű tisztított nyúl plazma TNF-et injektálunk be, alumínium-hidroxid-géllal együtt. Az első immunizálás után 9 héttel szív-punkcióval levesszük az összes vért, és lecentrifugáljuk. Nyúl plazma TNF elleni antitestet tartalmazó antiszérumot kapunk.

Az antiszérumot normál nyúl szérum-protein komponensekkel kapcsolt Sepharose 4B oszlopra viszzük. Ezt 3-szor megismételve nyúl plazma TNF-re specifikus tisztított antitestet kapunk. Immuno-elektroforézissel és kettős géldiffúziós módszerrel kimutattuk, hogy az antitest csak a tisztított nyúl plazma TNF- fel képez precipitációs vonalat.

A kapott tisztított antitest 60 000-szeres hígításban 50%-ban semlegesíteni képes 500 egység (L-929) nyúl plazma TNF citotoxikus aktivitását. Az antitest 1000-szeres hígításban teljesen semlegesíti 50 egység (LM) nyúl plazma TNF citotoxikus aktivitását.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás az

(Y)_p-(X)_n-(B)_m-A (I)

általános képletű, humán tumor nekrozis faktor po- 5

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

képletű polipeptid, amelyből egy vagy több aminosav hiányozhat, vagy amelyben egy vagy több aminosav más aminosavval lehet helyettesítve, de a homológia mértéke legalább 95%;

B jelentése

Ser-Ser-Ser-Arg (Ib)

képletű peptid, amelyből 1-3 aminosav hiányozhat, X jelentése az érett TNF-ben nem szereplő, teljes vagy részleges prekursor-szekvencia,

Y jelentése Met és

m, n és p értéke 1 vagy 0 -,

azzal jellemezve, hogy

(i) humán makrofágokat indukálószer(ek)kel együtt tenyésztünk,

(ii) a makrofágokból elválasztjuk a humán tumor nekrozis faktor poliA mRNS-t tartalmazó frakciót,

(iii) a mRNS-ből egyszálú cDNS-t készítünk, reverz 40

transzkriptáz alkalmazásával, majd azt kettős szálú cDNS-sé alakítjuk,

(iv) a kettős szálú cDNS-t egy vektorba illesztjük,

(v) a rekombináns vektort Escherichia coliba vite az transzformáljuk, és egy cDNS génállományt állítunk elő,

(vi) kiválasztjuk a hINF-et kódoló klónokat és

(vii) a génállományból klónozzuk a humán tumor nekrozis faktort kódoló cDNS-t.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás az

(Y)_p-(X)_n-(B)_m-A (I)

általános képletű aminosavszekvenciát kódoló DNS, vagy a 3'-végen egy terminációs kodont tartalmazó fenti bázisszekvencia előállítására - a képletben A, B, Y, m, n és p jelentése az 1. igénypont tárgyi

körében megadott, és

X jelentése

Ser	Thr	Glu	Ser	Met	Ile	Arg	Asp	Val	Glu	(Ic)
Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Leu	Pro	Lys	Lys	Thr	
Gly	Gly	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Cys	Leu	
Phe	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	
Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Phe	Cys	Leu	Leu	
His	Phe	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Gln	Arg	Glu	
Glu	Phe	Pro	Arg	Asp	Leu	Ser	Leu	Ile	Ser	
Pro	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg				

képletű polipeptid -, azzal jellemezve, hogy a megfelelő cDNS-eket klónozzuk. (Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás az olyan

(Y)_p-(X)_n-(B)_m-A (I)

általános képletű aminosavszekvenciát kódoló DNS, vagy a 3'-végen egy terminális kodont tartalmazó fenti bázisszekvencia előállítására, ahol a képletben

A jelentése az 1. igénypontban megadott (Ia)

képletű polipeptid,

B jelentése az 1. igénypontban megadott (Ib)

képletű peptid,

Y és p jelentése az 1. igénypontban megadott,

X jelentése a 2. igénypontban megadott (Ic)

képletű polipeptid, és

m és n értéke 1,

60

azzal jellemezve, hogy a megfelelő cDNS-eket klónozzuk. (Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A$ (I)

általános képletű aminosavszekvenciát kódoló DNS, vagy a 3'-végen terminációs kodont tartalmazó fenti bázisszekvencia előállítására, ahol a képletben

A jelentése az 1. igénypontban megadott (Ia) képletű polipeptid,

B jelentése az 1. igénypontban megadott (Ib) képletű peptid,

m értéke 1,

n értéke 0, és

Y és p jelentése az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő cDNS-eket klónozzuk. (Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A$ (I)

általános képletű aminosavszekvenciát kódoló DNS, vagy a 3'-végen terminációs kodont tartalmazó fenti bázisszekvencia előállítására, ahol a képletben

A jelentése az 1. igénypontban megadott (Ia) képletű polipeptid,

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

képletű polipeptid, amelyből egy vagy több aminosav hiányozhat, vagy más aminosavval lehet helyettesítve, de a homológia mértéke legalább 95%,

B jelentése

Ser-Ser-Ser-Arg (Ib)

X képletű peptid, amelyből 1-3 aminosav hiányozhat, jelentése az érett TNF-ben nem szereplő, teljes vagy részleges prekursor-szekvencia,

Y jelentése Met és

m, n és p értéke 1 vagy 0 -,

előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a humán tumor nekrozis faktor polipeptidet kódoló 1. igénypont szerinti eljárással előállított DNS-t kívánt esetben egy he-

n és m értéke 0, és

Y és p jelentése az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő cDNS-eket klónozzuk. (Elsőbbsége: 1984. 08. 17.)

5 6. Az 1. igénypont szerinti eljárás olyan

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A$ (I)

általános képletű aminosavszekvenciát kódoló DNS, vagy a 3'-végen terminációs kodont tartalmazó fenti bázisszekvencia előállítására, ahol a képletben

10 A jelentése olyan (Ia) képletű polipeptid, amelyből egy vagy több aminosav hiányzik, vagy más aminosavval van helyettesítve, de a homológia mértéke legalább 95%,

m és n értéke 0, és

15 Y és p jelentése az 1. igénypontban megadott, *azzal jellemezve*, hogy a megfelelő cDNS-eket klónozzuk. (Elsőbbsége: 1984. 08. 17.)

7. Eljárás az

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A$ (I)

20 általános képletű humán tumor nekrozis faktor polipeptid - a képletben

A jelentése

45 terológ polipeptidet kódoló DNS-sel összekapcsolunk, egy expressziós vektorba illesztünk, a rekombináns vektorral Escherichia colit transzformálunk, a transzformált baktériumot tenyésztjük, és a tenyészetből kinyerjük a polipeptidet.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

8. Az 7. igénypont szerinti eljárás olyan

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A$ (I)

50 általános képletű polipeptid előállítására, amelynek képletében

A, B, Y, m, n és p jelentése a 7. igénypontban megadott, és

X jelentése

55

Ser	Thr	Glu	Ser	Met	Ile	Arg	Asp	Val	Glu	(Ic)
Leu	Ala	Glu	Glu	Ala	Leu	Pro	Lys	Lys	Thr	
Gly	Gly	Pro	Gln	Gly	Ser	Arg	Arg	Cys	Leu	
Phe	Leu	Ser	Leu	Phe	Ser	Phe	Leu	Ile	Val	

Ala	Gly	Ala	Thr	Thr	Leu	Phe	Cys	Leu	Leu
His	Phe	Gly	Val	Ile	Gly	Pro	Gln	Arg	Glu
Glu	Phe	Pro	Arg	Asp	Leu	Ser	Leu	Ile	Ser
Pro	Leu	Ala	Gln	Ala	Val	Arg			

képletű polipeptid,
azzal jellemezve, hogy a megfelelő klónozott cDNS-
t illesztjük az expressziós vektorba.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

9. A 7. igénypont szerinti eljárás olyan

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A(I)$

általános képletű polipeptid előállítására, amelynek
képletében

A jelentése a 7. igénypontban megadott (Ia)

képletű polipeptid,

B jelentése a 7. igénypontban megadott (Ib)

képletű peptid,

X jelentése a 8. igénypontban megadott (Ic)

képletű polipeptid,

m és n értéke 1, és

Y és p jelentése a 7. igénypontban megadott, az-
zal jellemezve, hogy a megfelelő klónozott
cDNS-t illesztjük az expressziós vektorba.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

10. A 7. igénypont szerinti eljárás olyan

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A(I)$

általános képletű polipeptid előállítására, amelynek
képletében

A jelentése a 7. igénypontban megadott (Ia)

képletű polipeptid,

B jelentése a 7. igénypontban megadott (Ib)

képletű peptid,

m értéke 1,

n értéke 0, és

Y és p jelentése a 7. igénypontban megadott, az-
zal jellemezve, hogy a megfelelő klónozott
cDNS-t illesztjük az expressziós vektorba.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

11. A 7. igénypont szerinti eljárás olyan

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A(I)$

általános képletű polipeptid előállítására, amelynek
képletében

A jelentése a 7. igénypontban megadott (Ia)

képletű polipeptid,

m és n értéke 0, és

Y és p jelentése a 7. igénypontban megadott, az-
zal jellemezve, hogy a megfelelő klónozott
cDNS-t illesztjük az expressziós vektorba.

(Elsőbbsége: 1984. 08. 17.)

12. A 7. igénypont szerinti eljárás olyan

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A(I)$

általános képletű polipeptid előállítására, amelynek
képletében

A jelentése a 7. igénypontban megadott (Ia)

képletű polipeptid,

B jelentése a 7. igénypontban megadott (Ib)

képletű peptid,

m értéke 1, és

n és p értéke 0,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő klónozott cDNS-
t illesztjük az expressziós vektorba.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

13. A 7. igénypont szerinti eljárás olyan

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A(I)$

általános képletű polipeptid előállítására, amelynek
képletében

A jelentése a 7. igénypontban megadott (Ia) képletű

polipeptid, és

m, n és p értéke 0,

azzal jellemezve, hogy a megfelelő klónozott cDNS-
t illesztjük az expressziós vektorba. (Elsőbbsége:
1984. 08. 17.)

14. A 7. igénypont szerinti eljárás olyan

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A(I)$

általános képletű polipeptid előállítására, amelynek
képletében

A jelentése olyan (Ia) képletű polipeptid, amelyből
egy vagy több aminosav hiányzik, vagy más amini-

savval van helyettesítve, de a homológia mértéke leg-
alább 95%,

m és n értéke 0, és

Y és p jelentése a 7. igénypontban megadott, az-
zal jellemezve, hogy a megfelelő klónozott
cDNS-t illesztjük az expressziós vektorba.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

15. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve,
hogy az

$(Y)_p(X)_n(B)_m-A(I)$

általános képletű aminosavszekvenciának – a kép-
letben p értéke 1, és A, B, X, Y, m és n jelentése az
1. igénypontban megadott – megfelelő bázisszekven-
ciát a bázisszekvencia 3'-végén egy terminációs ko-
donnal kívánt esetben egy heterológ polipeptidet kó-
doló DNS-sel összekapcsolunk és működőképesen egy
transzkripció promotert tartalmazó expressziós vek-
torba illesztjük.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

45 16. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemez-
ve, hogy transzkripció promoterként trp promotert
vagy tac promotert használunk.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

50 17. A 15. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemez-
ve, hogy a 15. igénypontban definiált (I) általános kép-
letű aminosavszekvenciának megfelelő, 3'-végén ter-
minációs kodont tartalmazó bázisszekvenciát a helyes
transzlációs leolvasási rendben a fuzionálódó proteint
kódoló másik bázisszekvenciához kapcsoljuk.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

55 18. A 17. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemez-
ve, hogy a fuzionálódó proteint kódoló másik bá-
zisszekvenciaként phoS gént használunk.

(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

60

19. A 15–18. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy vektorként *Escherichia coli* plazmidot használunk.

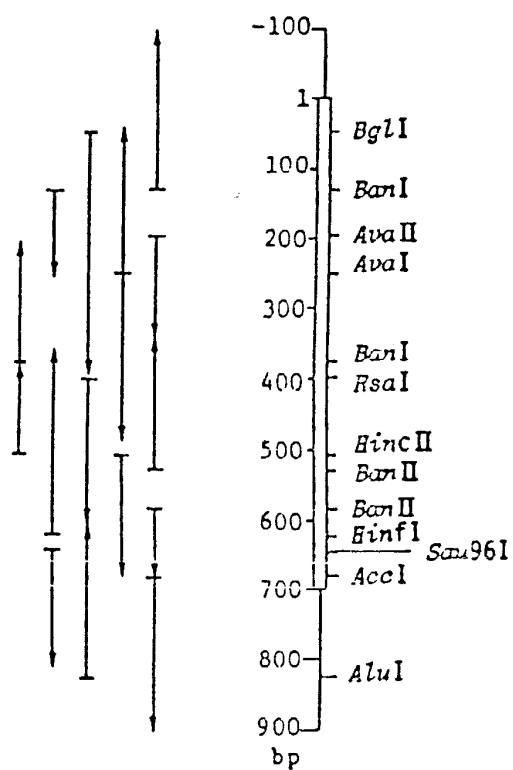
(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy *Escherichia coli* plazmidként pBR322 plazmidot használunk.

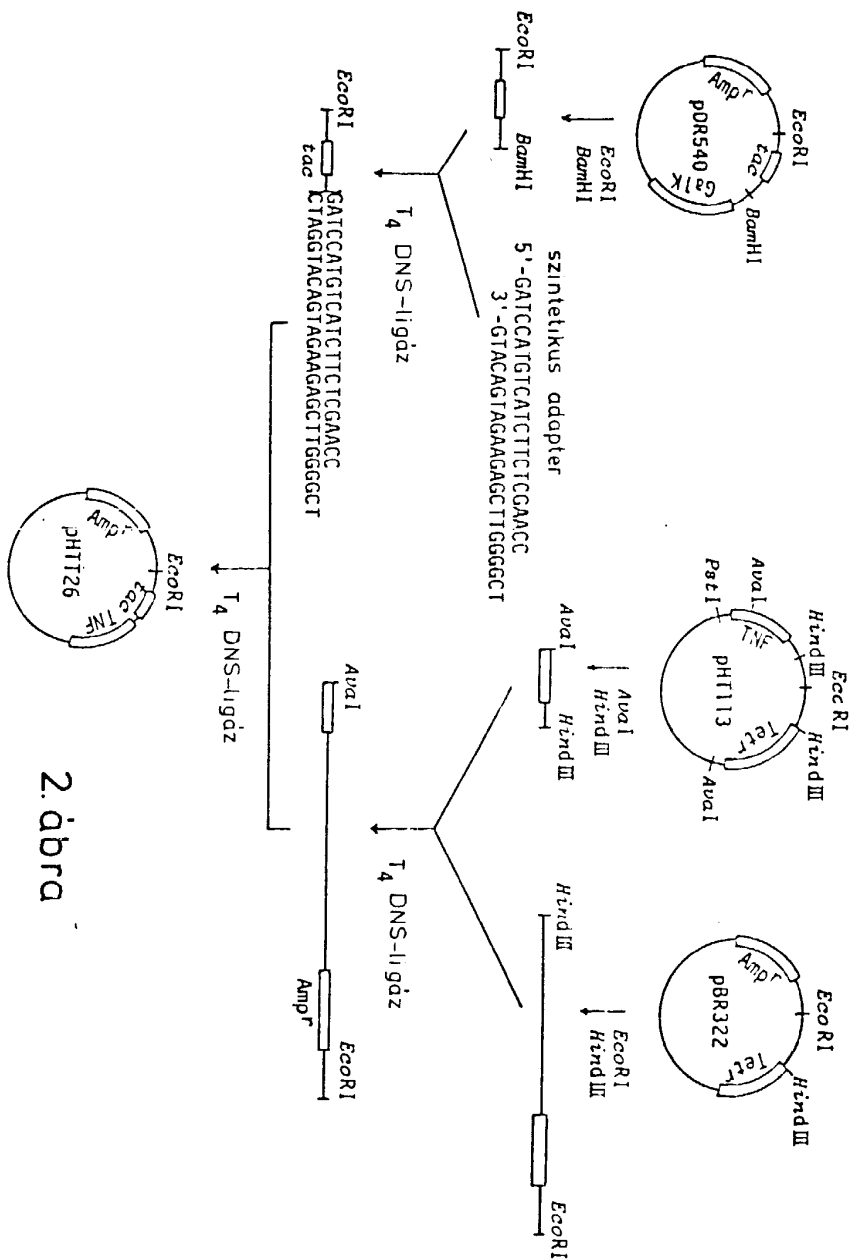
(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)

21. Eljárás daganatellenes hatású gyógyszerkészítmények előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 7. igénypont szerinti eljárással előállított humán tumor nekrosis faktor polipeptidet, vagy annak biológiailag aktív részét vagy a fenti polipeptidet tartalmazó polipeptidet a gyógyszerkészítésben szokásosan használt hordozó- és/vagy egyéb segédanyagokkal összekeverve gyógyászati készítménnyé alakítjuk.

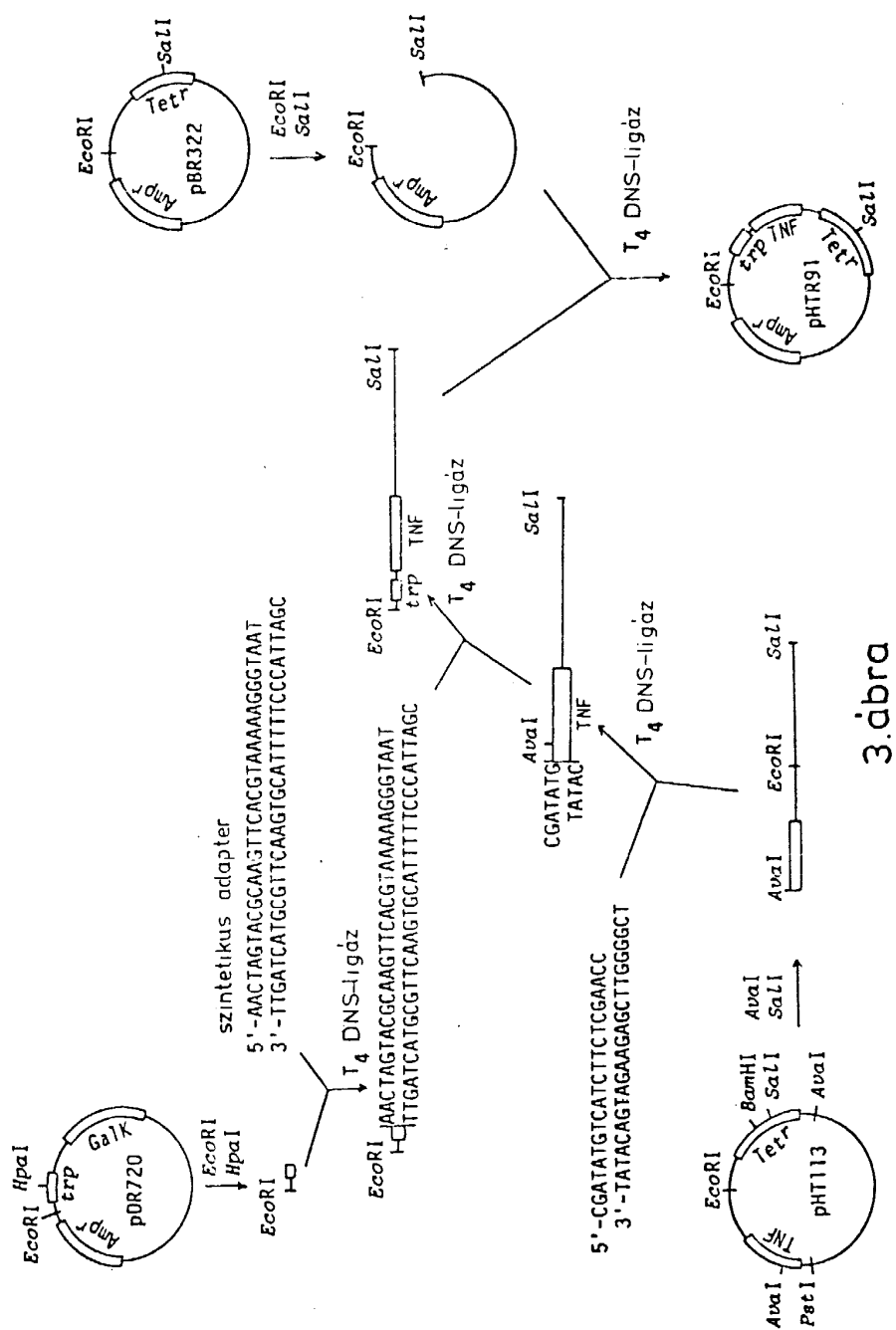
(Elsőbbsége: 1984. 03. 06.)



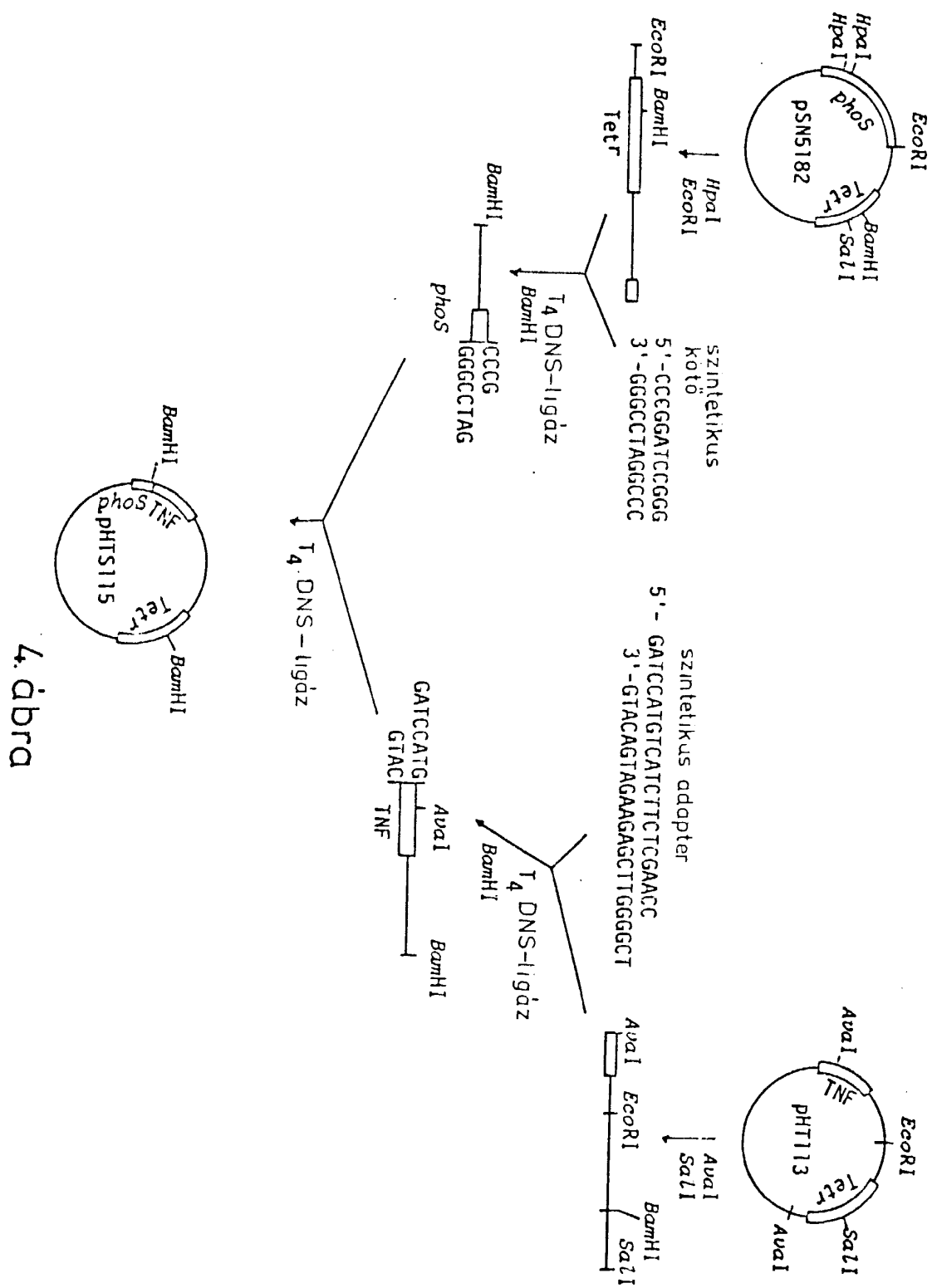
1. ábra



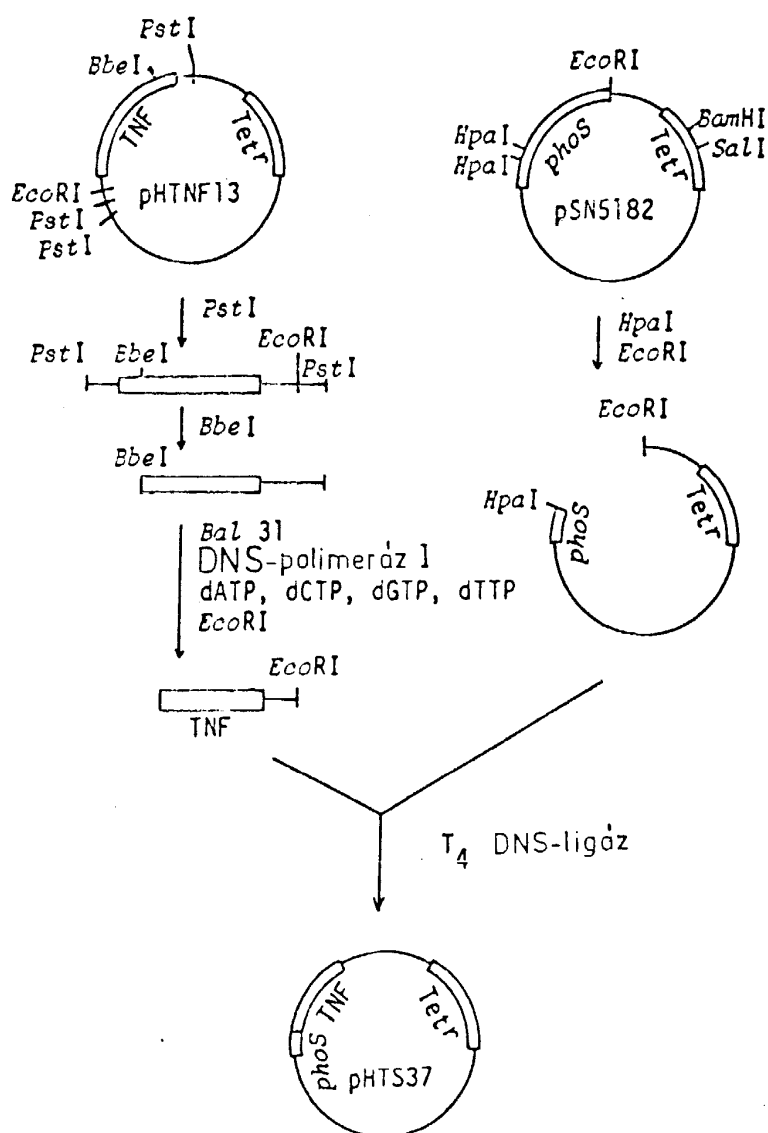
2. ábra



3. ábra



4. ábra



5. ábra