

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

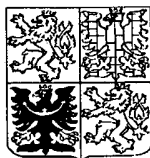
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

5059-85

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **05. 07. 85**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.07.84**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **84/628342**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **11. 11. 98**
(Věstník č. 11/98)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/27
C 12 P 21/02
A 61 K 38/00

(71) Přihlášovatel:

NOVARTIS AG, Basel, CH;

(72) Původce:

Clark Steven C., Winchester, MA, US;

Kaufman Randal J., Boston, MA, US;

Wong Gordon G., Cambridge, MA, US;

Wang Elizabeth, Carlisle, MA, US;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Vektor zahrnující gen kódující bílkovinu
GM-CSF primátů, hostitelská buňka,
která je jím transformována, a způsob
výroby bílkoviny GM-CSF primátů za
jejího použití**

(57) Anotace:

Popisuje se vektor zahrnující gen kódující bílkovinu GM-CSF primátů, která má aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 1 za šipkou pro CSF-Thr, CSF-Ile nebo CSF-G, nebo její alelické nebo jiné funkční ekvivalenty, zachovávající si aktivitu GM-CSF v testu na lidské kostní dřeni, ve kterých je alespoň jedna aminokyselina přidána, nahrazena nebo odstraněna. Dále se popisuje hostitelská buňka, která je transformována tímto vektorem, a způsob výroby výše uvedené bílkoviny za jejího použití a rovněž cDNA, která odpovídá výše uvedenému genu.

CZ 5059-85 A3

00.00.00 DLR

PU SW9-85

~~13578~~

Vektor zahrnující gen kódující bílkovinu GM-CSF primátů, hostitelská buňka, která je jím transformovaná, a způsob výroby bílkoviny GM-CSF primátů za jejího použití

Oblast techniky

Vynález se týká vektoru, který zahrnuje gen kódující bílkovinu GM-CSF primátů, hostitelské buňky, která je jím transformovaná, a způsobu výroby bílkoviny GM-CSF primátů za jejího použití a rovněž cDNA, která odpovídá výše uvedenému genu.

Dosavadní stav techniky

Různé typy buněk, které se nacházejí v krvi, je možno všechny odvodit od základních buněk, které se mohou dále diferencovat. Tyto základní buňky mají dvě funkce: /1/ reprodukují samy sebe, takže udržují populaci základních buněk v těle a /2/ vytvářejí další buňky, které se diferencují do různých zralých typů krevních buněk. Buňka, která se diferencuje určitým způsobem, se nazývá progenitor. Progenitor pro lymfocyty T, lymfocyty B, granulocyty,

červené krvinky, destičky a eosinofilní buňky, jakož i nezralé progenitory, které mohou dávat vznik různým typům zralých buněk byly pokusně studovány jak in vivo, tak in vitro, jak je popsáno například v publikaci Dexter, T.M. 1983 J. Pathology 141 415 - 433. In vitro bylo možno prokázat, že prolyferace a/nebo diferenciací každého typu progenitoru závisí na specifických "faktorech", které je možno odvodit z různých zdrojů. Například progenitory pro červené krvinky vyžadují přítomnost faktorů, který byl nazván erythropoietin. Faktory, kterých je zapotřebí pro přežití, prolyferaci a diferenciaci myeloidních progenitorů pro tvorbu zralých neutrofilních granulocytů, monocytů a zralých makrofágů se nazývají faktory, které podporují tvorbu kolonií (CSF).

Účinnost těchto faktorů byla velmi důkladně studována u myší. Většina orgánů dospělých myší produkuje látku s účinností CSF. Sloučeniny, které mají určitou účinnost tohoto typu byly získány z různých tkání a různými způsoby, tyto látky se však od sebe poněkud liší svými biochemickými vlastnostmi. Z tohoto důvodu zůstává strukturní příbuznost různých faktorů zatím neznáma. Mimoto se zdá, že CSF působí pravděpodobně ve více než jednom stupni vývoje gra-

nulocytů a makrofágů, přičemž opět není známo, zda je jediný faktor zodpovědný za všechny typy účinnosti nebo zda je zapotřebí, aby v každém stupni působil jiný faktor, jak je podrobněji popsáno v publikaci Burgess, A. a Metcalf, D. 1980 Blood 56 947 - 957 .

Látka s účinností lidského CSF byla získána z placenty, některých ~~plac~~ plodu, z makrofágů a ze stimulovaných T-buněk. Linie T-buněk (Mo), která vytváří jednu nebo větší počet látek s účinností CSF byla získána z nemocného s leukemií, při níž byly zmnoženy určité varianty buněk T (Leukemická retikuloendothelliosa), jak bylo popsáno v publikaci Golde a další 1978 Blood 52 1068 - 1072.

Schopnost CSF stimulovat granulocyty a makrofágy znamená, že farmaceutické prostředky s touto účinností by by^{lo} možno klinicky použít v těch situacích, kdyby bylo zapotřebí zvýšit produkci buněk myeloidního typu. Někteří nemocní s velmi vysokými hladinami normálních granulocytů měli ve skutečnosti nádory, které produkovaly příliš veliké množství CSF. V jednom případě došlo po chirurgickém odstranění nádoru k rychlému poklesu počtu granulocytů na normální hladinu, což by vedlo k názoru,

že tímto způsobem by bylo možno regulovat počet obíhajících granulocytů. Tento názor byl vysloven také v publikaci Hocking, W., Goodman, J., a Golde D., Blood 61 600 (1983). Farmaceutické prostředky s obsahem CSF je možno užít klinicky při léčbě potlačení dřeně, která je způsobena po ozáření nádorů nebo při chemické léčbě těchto nádorů. Mimo to farmaceutické prostředky s obsahem CSF by mohly být užitečné při léčbě těžkých infekcí, protože CSF může zvýšit počet granulocytů a/nebo monocytů a/nebo může tyto elementy aktivovat.

Existují různé typy známé účinnosti CSF, včetně granulocytární účinnosti (G-CSF), účinnosti na makrofágy (M-CSF), účinnosti na granulocyty i makrofágy (GM-CSF) a účinnosti na větší počet těchto buněk. Vynález se zvláště zabývá otázkou výroby GM-CSF. Bílkoviny tohoto typu již byly izolovány z různých živočišných zdrojů, vynález se však zvláště týká výroby CSF ssavců, zvláště člověka a opic.

~~Biologické a biochemické studie látek~~
s účinností CSF byly až dosud brzděny skutečností, že jednak bylo těchto látek k dispozici velmi malé množství, zvláště pokud jde o CSF lidí a/nebo dalších primátů, jednak byly tyto látky nečisté. Je zřejmé,

že by bylo žádoucí přesně identifikovat bílkovinu nebo bílkoviny, které jsou nositeli účinnosti CSF. Dále by bylo žádoucí získat stálý zdroj CSF, s výhodou primátů a zvláště člověka, tak, aby bylo možno snadno získat tyto bílkoviny ve větším množství a s čistotou, která je dostatečná pro zjištění biologických a biochemických vlastností těchto látek, aby ~~by~~ pak bylo možno použít k léčbě.

V poslední době byla vyvinuta technika molekulárního klonování, která dovoluje klonovat sled nukleotidů, který je kádem pro bílkoviny a tak získat bílkovinu ve větším množství při vhodné volbě hostitele a vektoru, jak bylo popsáno v ~~knize~~ publikaci Maniatis, T. Molecular Cloning - A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. 1982. Bílkovinu je možno izolovat a čistit běžnými způsoby. Způsoby klonování, které byly až dosud použity je možno obecně rozdělit na tři skupiny: (1) způsoby, které jsou založeny na znalosti struktury bílkoviny, například na znalosti sledu aminokyselin, (2) způsoby, založené na identifikaci bílkoviny, ^k jejíž expresi došlo při použití klonovaného genu použitím protilátky, specifické pro tuto bílkovinu a (3) způsoby, založené na identifikaci RNA,

kterou je pak možno podrobit translaci za získání bílkoviny, pro niž je kódem uvedený gen.

Všechny tyto způsoby jsou velmi ne-
snadné v případě, že bílkovina, například CSF je k
dispozici ve velmi malém množství. Znamená to, že
v případě, že je nesnadné získat dostatečné množství
čištěné bílkoviny, je také nesnadné stanovit sled
aminokyselin této bílkoviny nebo alespoň část tohoto
sledu. Identifikace bílkoviny ^{je} ~~př~~ expresi vazbou na
protilátku se s výhodou provádí při použití monospe-
cifického polyklonálního antisera s vysokým titrem.
Toto antiserum však rovněž nelze získat bez většího
množství čisté bílkoviny, která se užije jako ~~ant~~ ⁺igen.
Monoklonální protilátka poskytuje alternativní pří-
stup, avšak požadovaná protilátka se také velmi ne-
snadno získává bez vhodného antigenu a mimo to mono-
klonální protilátka nemusí reagovat s bílkovinou ve
formě, v níž u této bílkoviny došlo k expresi při
dostupném systému hostitele a vektoru. Mimo to k
~~translaci RNA za získání identifikovatelné bílkovi-~~

ny je zapotřebí, aby požadovaná RNA byla přítomna
ve zdroji RNA v dostatečném množství, aby ji bylo
možno oddělit. Relativní dostatek RNA, která je kó-
dem pro určitou bílkovinu, jde obvykle ruku v ruce

00-00-00

54/88

s dostatkem proteinu, takže je možno říci, že protein vyskytující se v malém množství je obvykle kódován mRNA, která se vyskytuje rovněž v malém množství.

Buněčná linie Mo byla užita jako výchozí materiál pro čištění lidského CSF a také pro identifikaci odpovídajících typů mRNA. Avšak i při použití tohoto poměrně dobrého zdroje CSF je nesmírně nesnadné izolovat dostatečné množství uvedené bílkoviny pro strukturální studie.

Podstata vynálezu

Vynález překonává problémy dosavadního stavu techniky tím, že poskytuje dobrý zdroj bílkoviny s aktivitou CSF, za použití genového inženýrství. Pro klonování cDNA kódující protein s aktivitou CSF lze použít nový způsob klonování, pro který je nutný pouze test aktivity CSF. Vhodné metody pro měření CSF jsou popsány dále v příkladu 2.

Vynález tedy popisuje vektor zahrnující gen kódující bílkovinu GM-CSF primátů, která má aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 1 za šipkou pro CSF-Thr, CSF-Ile nebo CSF-G, nebo její alelické nebo jiné funkční ekvivalenty, zachovávající si aktivitu GM-CSF v testu na lidské kostní dřeň, ve kterých je alespoň jedna aminokyselina přidána, nahrazena nebo odstraněna. Vynález rovněž popisuje cDNA kódující bílkovinu s aktivitou CSF (tedy CSF/cDNA), mikroorganismus nebo buněčnou linii (hostitelskou buňku), transformovanou rekombinantním vektorem obsahujícím takovou CSF/cDNA a způsob výroby bílkoviny GM-CSF primátů pomocí exprese CSF/cDNA, při kterém se kultivuje výše uvedený mikroorganismus nebo buněčná linie. Jelikož je tato bílkovina produkována buňkou podle vynálezu, je jisté, že se jedná o bílkovinu vykazující aktivitu CSF. Vektor pro transformaci obsahující CSF/cDNA lze připravit a izolovat následujícím způsobem, při kterém se:

JYF78

připraví RNA z buňka, která produkuje CSF;
z uvedené RNA se připraví polyadenylovaná mRNA;
z uvedené mRNA se připraví cDNA s jednoduchým řetězcem;
tato cDNA s jednoduchým řetězcem se převede na cDNA s
dvojitým řetězcem;
tato cDNA s dvojitým řetězcem se včlení do vektoru pro
transformaci a tímto vektorem se transformují bakterie za
vzniku kolonií;
spojí se vždy 200 až 500 kolonií a z každé skupiny kolonií se
izoluje plasmidová DNA;
plasmidovou DNA se transfektují vhodné hostitelské buňky pro
expresi bílkoviny CSF;
transfektované buňky se kultivují a u supernatantu se testuje
aktivita CSF; a
vyberou se vzorky pozitivní na CSF a kolonie použité pro
vytvoření pozitivních vzorků se zkoumají pro zjištění, která
kolonie vykazuje aktivitu CSF.

Tyto bílkoviny CSF jsou růstové a diferenciační hormony
pro buňky myeloidního systému. Jsou určeny například pro
klinické použití pro léčení myelosuprese, zejména v případě
(symptomatické) granulocytopenie po chemické léčbě nádorů
nebo léčbě nádorů ozařováním.

Popis obrázků na výkresech

Obr. 1 znázorňuje sled (sekvenci) DNA, který je
kódem pro bílkovinu CSF. Úplná sekvence DNA kóduje lidský
CSF. Změny uvedené u lidského sledu jsou rozdíly, které
odlišují tento sled od sledu opice

Gibbon. Znázorněn je rovněž sled aminokyselin, který vzniká při použití uvedeného sledu DNA.

Na obr. 2 je schematicky znázorněn způsob výroby plasmidu pTPL z plasmidu pAdD26SVpA(3).

Obr. 3 je schematický pokračováním obr. 2 a znázorňuje způsob výroby plasmidů p91023 z plasmidu pTPL.

Obr. 4 je schematickým pokračováním obr. 3 a znázorňuje plasmid p91023(B).

Dále bude uvedeno vysvětlení některých pojmů k usnadnění porozumění způsobu podle vynálezu. Pokud by se ~~na~~ rozsah definice odlišoval od běžného rozsahu v oboru, bude to dále uvedeno.

Amplifikace nebo pomnožení znamená pochod, při němž buňka produkuje opakovaně genu s vlastní chromosomální DNA.

CSF je látka s biologickým účinkem, která je dále definována metodami stanovení.

Bílkovina CSF je bílkovina z primátů, která má účinnost CSF. Pro potřeby vynálezu je pojem CSF jako bílkovina užíván i pro modifikované bílkoviny CSF, alelové ^{idy} variace bílkoviny CSF a

pro tuto bílkovinu i v případě, že je před její řetězec zařazen zbytek MET.

Směrem dolů znamená směrem ke 3'-zakončení nukleotidového sledu.

Sled, podporující reakci je nukleotidový sled, který může způsobit potenciaci transkripce genu nezávisle na své poloze vzhledem k tomuto genu nebo na orientaci sledu.

Gen je sled deoxyribonukleotidů, který je kódem pro danou bílkovinu. Pro účely vynálezu gen nemá obsahovat oblasti, které jsou pro translaci zbytečné, například signální sledy, polyadenylové řetězce, promotory nebo podpůrné sledy.

Vazba je způsob, při němž dochází ke tvorbě fosfodiesterové vazby mezi 5'-zakončením a 3'-zakončením dvou řetězců DNA. Vazbu je možno provést několika známými způsoby při použití enzymů včetně T4 ligázy.

Orientace je pořadí nukleotidů ve sledu DNA. Převrácená orientace sledu DNA je taková orientace, při níž je pořadí 5'- a 3'-zakončení jednoho sledu obráceno vzhledem k tomuto pořadí ve druhém sledu. Toto uložení je důležité pro

transkripci dalšího sledu DNA ve zdroji DNA nebo pro replikaci vektorů, které obsahují uvedený sled.

Transkripce je syntéza RNA z původní DNA.

Transformace znamená změnu genotypu buňky tím, že buňka přijme cizorodou DNA. V některých případech je možno transformaci prokázat změnou fenotypu buňky. Transformované buňky se nazývají transformanty, buňky před transformací jsou původní buňky.

Translace je syntéza polypeptidů z mRNA.

Účinnost CSF je možno získat z velkého počtu buněčných zdrojů včetně prostředí, v němž se nacházejí mononukleární buňky periferní krve, z plicní a placentární tkáně, z kostní dřeně, z moči nemocných, který trpí chudokrevností, z krevního séra a z normálních a neoplastických linií T-lymfocytů a mononukleárních fagocytů. Jednou buněčnou linií, která produkuje CSF je linie Mo. SSF, produkováné touto buněčnou linií je znám jako CSF pro granulocyty a makrofágy (GM-CSF), jde o lidský CSF. Jeden zdroj CSF opice Gibbon je linie T-buněk, která je označena jako UCD MLA-144. Tato buněčná

linie byla uložena ve sbírce ATCC, odkud je možno ji získat pod číslem uložení.

Aby bylo možno izolovat klon CSF podle vynálezu, bylo nutno použít nového způsobu, který vyžaduje zejména stanovení účinnosti CSF. Nejprve je nutno identifikovat buňku, která produkuje CSF, například T-lymfocyty nebo jiné buňky, jak bylo uvedeno svrchu. Pak se izoluje mRNA této buňky. S výhodou se užívá T-lymfocytů. V tomto případě s mRNA, která je vázána na membránu a obsahuje m-RNA pro lymfokiny^{se} oddělí od volné mRNA v buňkách. Tímto oddělením se obohatí izolovaná mRNA 5 až 10krát o sled, který je nutný pro výrobu lymfokinů a tím se snižuje námaha, vynalezená na identifikaci příslušného klonu. Pak se připraví chromatografií na oligo dT celuloza² polyadenylová mRNA.

Z mRNA se připraví skupina cDNA při použití vektoru, vhodného pro přenesení do hostitele k expresi požadované bílkoviny s účinností CSF. Pak se připraví cDNA použitím standardních způsobů ze svrchu získané mRNA. Hybridní RNA/cDNA se pak převede na cDNA s dvojitým řetězcem a tento materiál je pak možno včlenit do vhodného vektoru .

Vhodný systém hostitele a vektoru pro izolaci klonu CSF je založen na expresi cDNA ve vhodném vektoru pro transformaci. Vhodným vektorem pro transformaci může být vektor, získaný přechodným včleněním DNA do buněk ssavců způsobem podle publikace Mellon, P., V. Parker, Y. Gluzman, T. Maniatis 1981 Cell 27 279 - 288. Aby bylo možno izolovat požadované transformanty CSF, není nutné, aby všechny buněk populace stabilně obsahovaly exogenní geny, které by bylo možno využít k expresi požadovaného CSF jako produktu. Je možné přechodně včlenit exogenní geny do subpopulace buněk tak, aby tato subpopulace produkovala požadovanou bílkovinu alespoň několik dnů. Protože není zapotřebí užít další látky k označení podle vynálezu, může dojít k tomu, že exogenní DNA se ztratí při buněčném růstu v průběhu jednoho až dvou týdnů. Avšak dva až tři dny pro přenesení do vhodných buněk ssavců je možno produkty nalézt a prokázat.

Systém hostitel a vektor, který je vhodný pro toto použití je buněčná linie opic CV-1, transformovaná působením defektní molekuly DNA SV40, jak bylo popsáno v publikaci Gluzman, Y., Cell 23 175 - 182, 1981. Transformované opičí buněk CV-1,

které obsahují defektní SV-40 DNA jsou označovány COS (CV-1, defektní, SV40), tyto buňky neobsahují úplnou kopii genomu SV-40, avšak produkují vysokou úroveň velkého antigenu T a dochází u nich k replikaci SV40 DNA. Tyto buňky také podporují replikaci SV40, které chybí na začátku některé části a bakteriálního plasmidu, který obsahuje SV40 podle publikace Myers, R.M. a Tjian, R. 1980 PNAS 77 6491 - 6495. Tento systém tedy představuje prostředek pro amplifikace přenesené exogenní DNA přes SV40 za zvýšení hladiny mRNA a bílkoviny, ^kjejíž expresi dochází za přítomnosti exogenní DNA. Je však možno užít i podobné systémy.

Vektory^R, užitá k expresi CSF, typicky obsahují další pomocné části jako ^{genomová transkripce} podpůrné sledy, promotory, introny, polyadenylovaná místa, 3'-nekóde^{ující} oblasti a aktivátory translace, jak bude dále podrobněji vysvětleno.

^{genomová transkripce} Vektory mohou obsahovat podpůrné sledy. Podpůrné sledy se odlišují od promotoru, avšak mají s ním podobný účinek. Jejich funkce na buněčné úrovni není ještě dobře známa, avšak jejich jedinečnou vlastností je schopnost aktivace nebo potenciace transkripce bez závislosti na jejich poloze nebo

orientaci. Promotory musí být uloženy směrem vzhůru, kdežto ^{genomní kaskáda} podpůrné sledy mohou být uloženy směrem vzhůru od 5'-zakončení promotoru, uvnitř genu jako intron nebo směrem dolů mezi genem a polyadenylovaným místem nebo 3'-zakončením polyadenylovaného místa. Promotory s převráceným sledem nejsou funkční, avšak převrácené podpůrné sledy jsou účinné. ^{genomní kaskáda} Podpůrné sledy mají vliv na promotory pouze v tom případě, že jsou přítomny na tomtéž řetězci DNA. Jejich úloha je podrobněji vysvětlena v publikaci Khoury a další, Cell 33, 313 - 314 (1983).

^{genomní kaskáda} Výhodné podpůrné sledy pro použití v buněkách ssavců je možno získat z živočišných viřů, například z opičího viru 40, z viru polyomu, z viru papillomu skotu, z retroviru nebo adenoviru. Ideální je, aby ^{genomní kaskáda} podpůrný sled byl odvozen od viru, pro který je buňka hostitele propustná, tj. z viru, který normálně infikuje buňky tohoto hostitele. ^{genomní kaskáda} Podpůrné sledy z virů je možno snadno získat z virů běžně dostupných ze sbírek. Oblasti ^{genomní kaskáda} podpůrných sledů z některých virů, například z viru Rousova sarkomu a opičího viru 40 jsou dobře známy, jak bylo popsáno v publikaci See Luciw a další, Cell 33, 705 - 716 (1983). Je rutinním postupem ~~k~~ molekulární biologie vyjmout

tyto oblasti podle známých map pro působení restrikčních enzymů pro jednotlivé viry a v případě potřeby modifikovat tyto oblasti, aby bylo možno včlenit ^{potřeba} ~~podpůrný~~ sled do vektoru požadovaným způsobem. Tyto postupy jsou popsány například v publikacích Kaufman a další, J. Mol. Biol., 159, 601 - 621 (1982) a Mol. Cell Biol. 2 (11), 1304 - 1319 (1982). Je také možno postupovat tak, že se ^{revizní} ~~podpůrný~~ sled syntetizuje z údajů, které jsou o sledu známy. ^{revizní} Podpůrné sledy z viřů obsahují obvykle méně než 150 párů bazí a jsou dostatečně malé, aby je bylo možné syntetizovat.

Další součástí vektoru by měl být polyadenylovaný sled. Jde o sled DNA, který je uložen směrem dolů od přenášené oblasti genu, obvykle těsně pod místem, v němž se zastavuje transkripce. Přidávají se obvykle adenin ^{me} ribonukleotidy, čímž vzniká polyadenin ^{me} nukleotidové zakončení na 3'-zakončení mRNA. Polyadenylace je důležitá pro stabilizaci mRNA proti degradaci v bunce, která může snížit množství mRNA a tím také množství výsledné bílkoviny.

Eukaryotická ^{8 y} polyadenilová zakončení jsou dobře známa. Hexanukleotid 5'-AAUAAA-3' se nachází 1 až 30 nukleotidů od místa, v němž polyadenylace už začíná. Sledy DNA, které obsahují polyadenylo-

vaný sled, je možno získat z virů podle ~~km~~ publikovaných zpráv. Polyadenylovaný sled je možno získat například z ^{mýšičího} ~~ničšího~~ beta-globinu a z opičího viru 40, avšak polyadenylovaná místa, izolovaná z virů jsou výhodnější. Protože tyto sledy jsou známe, je možno je syntetizovat in vitro a navázat na vektory běžným způsobem.

Sled, který odděluje polyadenylovaný sled od kodonu, v němž se zastavuje translace, je s výhodou ^{nepřenosná DNA sekvence} ~~nepřenášený~~ sled DNA, například eukaryotický gen bez promotoru. Protože promotor není přítomen, k expresi sledu nedojde. Tento sled by měl být dostatečně dlouhý, řádu až přibližně 1000 bazí od kodonu pro ukončení translace k polyadenylovanému sledu. Tento 3' - ^{nepřenosná} ~~nepřenášený~~ sled má obvykle za následek zvýšení výtěžku výsledného produktu. Vektor může končit přibližně 30 párů bazí směrem dolů od polyadenylovaného sledu, je však výhodnější zachovat 3'-sledy, které se nachází směrem dolů od polyadenylovaného sledu v jejich původní formě. Jde o sledy, které mají obvykle 20⁰ až 600 párů bazí směrem dolů od polyadenylovaného sledu.

Přítomnosti intronů v ^{nepřenosná} ~~nepřenášené~~

části vektoru může rovněž zvýšit výtěžky výsledného

produktu. Tyto introny je možno získat i z jiných zdrojů než z buněk hostitele nebo z genu ^{genů z adenoviru}. Je například možno užít hybridní intron, který se izoluje z adenoviru nebo z genu pro imunoglobulin, včleněného směrem dolů od místa pro počátek transkripce v adenoviru, čímž je možno zvýšit výtěžek výsledného produktu.

Při výhodném provedení způsobu pro klonování CSF a pro konstrukci vektoru pro expresi je možno užít aktivačního genu pro translaci. Aktivátory translace jsou geny, které jsou kódem pro bílkovinu nebo pro RNA, které ovlivňují translaci požadované mRNA. Nejlepším příkladem je gen, který je spojený s ~~xiixm~~ adenovirem (VAVAI), u tohoto genu dochází k transkripci a interakci se sledem v 5' ^{neprerušované} ~~-nepřerušované~~ oblasti mRNA adenoviru, jak bylo popsáno v publikaci Thimmappaya a další, 1982 Cell 3 543. Potřebné sledy pro aktivaci translace působením VA RNA leží v oblasti vedoucího sledu mRNA adenoviru. Tento sled pochází z genomu adenoviru a nachází se po transkripci v blízkosti 5'-zakočení. VA RNA může aktivovat translaci mRNA. Vektory pro klonování a expresi cDNA tedy s výhodou obsahují tuto formu genů z genu adenoviru VA.

neprerušované

Tyto vektory mohou být syntetizovány známým způsobem. Složky vektorů, například

replikace
~~podpůrné sledy~~, promotory a podobně je možno získat z přírodních zdrojů nebo syntetizovat, jak bylo uvedeno svrchu. Zásadně v případě, že tyto složky je možno nalézt v DNA, kterou je možno získat ve velkém množství, například jako složku virů nebo je-li možné tyto složky snadno syntetizovat, pak je možno tyto složky snadno získat při použití restričních enzymů a tím získat i velká množství vektorů tak, že se pěstuje organismus, který je zdrojem DNA, DNA se rozštěpí příslušnou endonukleásou, fragmenty se oddělí, fragment s obsahem hledaného sledu se identifikuje a izoluje. Obvykle se vektor pro transformaci získá v malém množství a pak se naváže na vhodný vektor pro syntézu, u něhož dochází k autonomní replikaci, například na prokaryotický plasmid nebo na fág. Ve většině případů je možno užít plasm^{idu} pB322, jak bylo popsáno ve svrchu uvedené publikaci Kaufmana a dalších.

Vektory pro syntézu jsou užity ke klonování vektorů pro transformaci běžným způsobem, například přenesením do prokaryotického organismu, replikací vektoru pro syntézu za získání vysokého

počtu kopií s následnou izolací tohoto vektoru rozštěpením buněk a izolací tohoto vektoru z buněčné drti.

Vektory s obsahem cDNA, připravené z buněk, které produkují látky s účinností CSF se pak přenesou do E. coli a pěstují na plotnách v Petriho miskách v množství přibližně 2000 kolonií v misce. Pak se kolonie přenesou na nitrocelulózový filtr a filtr se přenesse na novou plotnu, která se uchovává jako vzorek. Po vypěstování kolonií se tyto kolonie pomnoží a srovnávají se s původními koloniemi tak, aby úseky filtrů bylo možno identifikovat s odpovídající částí plotny, užité jako vzorek.

Každý filtr se rozřeže na úseky, které obsahují předem stanovené počty kolonií, s výhodou přibližně 200 až 500 kolonií na úsek. Kolonie z každého úseku se přenesou do živného prostředí, například do L-bujonu, kde bakterie se oddělí odstředěním a izoluje se plasmidová DNA. Plasmidová DNA z každého úseku filtračního papíru se přenesse do vhodného hostitele k dosažení exprese bílkoviny. Výhodným vektorem pro syntézu je

mutanta ^{la} plasmidu pBR322 z E. soli, v němž byly vynechány sledy, které poškozují eukaryotické buňky, jak bylo popsáno ve svrchu uvedené citaci Kaufmana a dalších. Při použití této mutanty odpadá potřeba zničit zbytek plasmidu před ^{neustálým} přenesením. Po vypěstování buněk po transfekci se prostředí zkoumá na přítomnost látek s účinností CSF. Positivní výsledek ukazuje na to, že ve zkoumaném úseku filtru se nachází kolonie, která obsahuje CSF/cDNA.

Aby bylo možno stanovit, který z klonů úseku filtru obsahuje CSF/cDNA, je zapotřebí vypěstovat každý klon z úseku filtru. Kultury se pak uloží do matrice a připraví se směs každé horizontální řady a každého vertikálního sloupce matrice. Z těchto směsí se připraví vzorky DNA a provede se transfekce do hostitelských buněk k dosažení exprese. Supernatanty, získané tímto způsobem se znovu zkoumají na účinnost CSF. V obvyklém případě má tato účinnost jedna směs vertikálního sloupce a jedna směs horizontální řady. Společný klon pak obsahuje CSF/cDNA. V případě, že matrice obsahuje více než jeden pozitivní klon, je pozitivní více než jeden sloupec a více než jedna řada. V tomto případě je

59/78

zapotřebí dále roztrždit malé množství klonů, u nichž by přítomnost CSF/cDNA padala v úvahu.

CSF/cDNA se z klonu izoluje pomocí restričních enzymů a známým způsobem je možno zjistit sled. Je zřejmé, že popsaný postup je možno použít k získání CSF/cDNA z jakéhokoliv zdroje. Úplný sled je znázorněn na obr. 1 současně s předpokládaným sledem aminokyselin bílkoviny, která je produktem po translaci.

Sled DNA, který je kódem pro bílkovinu s účinností CSF, tak, jak je znázorněn na obr. 1, může být modifikován běžným způsobem, čímž je možno získat pozměněný výsledný protein CSF, který stále má požadovanou účinnost při testech. Je například možno jednu, dvě, tři, čtyři nebo pět aminokyselin nahradit jinými aminokyselinami. V belgickém patentovém spisu č. 898 016 se popisuje typický způsob náhrady cysteinu například serinem.

CSF/cDNA podle vynálezu obsahuje úplný gen, kterému předchází kodon ATG a CSF/cDNA, který je kódem pro alelické variace bílkoviny CSF. Jedna alela je znázorněna na obr. 1. Další alela, která byla nalezena při práci na vynálezu má thymidinový zbytek v poloze 365 místo cytosinového zbytku, který je znázorněn na obr. 1. Bílkovina CSF, získaná podle vynálezu, zahrnuje také 1-methioninový derivát (Met-CSF) a alelické variace bílkoviny CSF. Úplná bílkovina CSF, tak, jak je znázorněna sledem na obr. 1, začíná sledem Ala-Pro-Ala-Arg..., jehož začátek je označen šipkou po nukleotidu v poloze 66 na obr. 1. V případě Met-CSF začíná tato látka sledem Met-Ala-Pro-Ala-Arg... Alelická variace, znázorněná na obr. 1, obsahuje Thr v poloze 100 (zbytek začíná u Ala za šipkou) a je možno ji označit jako CSF (Thr). Jiná variace má zbytek Ile v poloze 100 a je možné ji označit jako CSF (Ile). Pro úplnost zde uvádíme, že zde používaná zkratka CSF-G označuje GM-CSF gibona.

00.00.00

1578

Čištěná bílkovina CSF má specifickou účinnost (aktivitu) alespoň 10^7 jednotek na mg bílkoviny a s výhodou alespoň 4×10^7 jednotek na mg bílkoviny, při provádění testu účinnosti na buňkách lidské kostní dřeně.

Systémy hostitel-vektor pro expresi CSF mohou být prokaryotické nebo eukaryotické, avšak vzhledem ke komplexnosti CSF je výhodnějším systémem pro expresi systém ze savce. Exprese se snadno dosáhne transformací prokaryotických nebo eukaryotických buněk vhodným vektorem pro CSF. Sled DNA, získaný výše uvedeným způsobem, může být exprimován přímo v buňkách savce za řízení vhodným promotorem. Je možno užít heterologní promotory, které jsou v oboru dobře známy. Aby bylo možno dosáhnout exprese CSF v prokaryotických buňkách nebo buňkách kvasinek, je nutno odstranit vedoucí sled (sled pro sekreci). Poloha kodonu pro N-zakončení úplného proteinu CSF je znázorněna na obr. 1. Jakmile se získá požadovaný klon CSF/cDNA, je možno užít příslušné známé prostředky k dosažení exprese bílkoviny CSF, například včlenění do příslušného vektoru, přenesení vektoru do příslušné buňky hostitele, selekce a transformace buněk a pěstování transformovaných buněk k dosažení exprese CSF. Takto získaná bílkovina CSF může mít methioninový zbytek na N-konci bílkoviny (jde tedy o Met-CSF). Úplné maturované (zralé) bílkoviny, produkované prokaryotickými a eukaryotickými buňkami budou mít sled aminokyselin popřípadě totožný, avšak eukaryotické buňky mohou produkovat produkt, který bude do určité míry jinak glykosylovaný než původní přírodní produkt.

Bílkovina CSF, k jejíž expresi došlo v příslušných prokaryotických nebo eukaryotických buňkách může být izolována a čištěna způsoby, které jsou v oboru známy. Dále je popsán nový způsob čištění, který umožňuje získat bílkovinu CSF z rekombinantních i přírodních zdrojů ve vysoké čistotě a s vysokou aktivitou.

10.09.98

17.1.98

Tento způsob odstraňuje problémy, dříve spojené s izolací a čištěním bílkoviny s účinností CSF. Bílkovina CSF, získaná tímto způsobem, má specifickou aktivitu alespoň 1×10^7 jednotek na mg bílkoviny, s výhodou alespoň 2×10^7 jednotek na mg bílkoviny, zvláště 4×10^7 jednotek na mg bílkoviny, při testování na buňkách lidské kostní dřeně.

Při práci uvedeným způsobem se bílkovina CSF čistí následovně: bílkovina se vysráží síranem amonným, přidávaným do vysycení na 80 %, čímž se získá peleta bílkoviny CSF, která se znovu suspenduje v roztoku pufru při pH 6 až 8 a takto získaný roztok se nanese na vrchol chromatografického sloupce, sloupec se promývá pufrem s obsahem chloridu sodného a odebírají se frakce s aktivitou CSF. Účinné frakce se slíjí, nanesou se na sloupec C4 v reverzní fázi a sloupec se vyjímá postupně zvyšovaným množstvím acetonitrilu v koncentraci 0 až 90 % k získání účinné frakce.

Popis čištění v souvislosti s vyobrazením

Na obr. 5 je znázorněna analýza čištěné bílkoviny CSF (SDS-PAGE).

Bílkovina CSF, která má být čištěna výše uvedeným způsobem, může být získána z libovolného z přírodních zdrojů popsaných výše jako výchozí zdroje pro genové inženýrství. Jedná se o řadu buněčných zdrojů včetně kondicionovaného média, například buněčné linie Mo nebo buněčné linie UCD MLA-144 gibona.

~~Bílkovina CSF může být produkována také za použití~~
genového inženýrství, jak je popsáno výše.

Výše uvedeným způsobem lze tedy čistit bílkovinu CSF z jakéhokoliv zdroje. Postupuje se tak, že se prostředí s výhodou zahustí ultrafiltrací na koncentraci bílkoviny alespoň 0,1 mg bílko-

viny/ml. Bílkovina se pak vysráží přidáním síranu amonného do nasycení 80 %. Výsledná peleta se znovu uvede v suspenzi ve vodném roztoku pufru o pH 6 až 8. Příkladem vhodných pufrů mohou být Tris-HCl, HEPES, citronan sodný a podobně.

Roztok v pufru se podrobí dělení chromatografií na sloupci. Vhodným materiálem pro použití v tomto sloupci je například oktylspharosa, DEAE-ultrogel, Aca44-ultrogel, Aca-54 ultrogel, a podobně. Je možno užít jeden nebo větší počet těchto materiálů po sobě k získání větší čistoty výsledné látky.

Z každého sloupce se odebírají frakce a tyto frakce se zkoumají na účinnost CSF. Účinné frakce se slijí a zředí se kyselinou trifluoroctovou (TFA), kyselinou heptafluormáseľnou (HFBA) a podobně, a materiál se nanese na sloupec C4 v reverzní fázi. Sloučenina s účinností CSF se pak vymývá při použití stoupajícího množství acetonitrilu od 0 do 90 % v TFA nebo HFBA, s výhodou v koncentraci 0,10 % až 0,15 % objemových, v závislosti na použité kyselině.

Frakce s účinností CSF se analyzuje na SDS polyakrylamidovém gelu elektroforézou, užíje se gel o koncentraci 13,5 %, jak bylo popsáno v publikaci Lammlí, U. Nature 227, 680 (1970). Je možno užít ještě další postupy k dosažení homogennější bílkoviny CSF. Čištěná bílkovina CSF po frakcionaci elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu poskytla heterogenní bílkovinu CSF s molekulovou hmotností v rozmezí 15 000 až 26 000 jednotek. Tato zjevná heterogenita je následkem veliké glykosylace bílkoviny a je běžnou vlastností glykoproteinu. Při frakcionaci méně čistého vzorku z buněk Mo stejným způsobem s analýzou bílkoviny prokázala přítomnost další bílkoviny s účinností CSF, jejíž molekulová hmotnost byla 28 000 až 30 000 jednotek.

Látky s účinností CSF se váží a znovu uvolňují z oktylsepáráry, DEAE ultrogelu a sloupce C4 v reverzní fázi. Přibližně 60 % účinnosti CSF se váže na Con-A sepharosu (40 % prochází bez zachycení) a je možno tuto látku pak vymýt ~~z~~ methylnanosidem.

alfa

Analýza molekulové hmotnosti rekombinantní CSF gelovou filtrací v prostředí s nízkým obsahem solí prokazuje, že přibližně 30 % účinnosti

tvořené sloučeninou s molekulovou hmotností 19 000 je homogenní, avšak 70 % materiálu se chová jako dimer, takže se vymývá v poloze, která odpovídá molekulové hmotnosti přibližně 38 000. V případě, že se do sloupce přidá chlorid sodný v koncentraci 1M, vymývá se veškerá účinnost v širokém vrcholu, který odpovídá sloučenině s molekulovou hmotností přibližně 19 000 jednotek.

Čištěná bílkovina CSF je stálá alespoň 16 hodin při teplotě 4 °C a pH 7,4 v 4M guanidin hydrochloridu, v 10 mM EDTA, 10mM 2-merkapt ethanolu a v 30% (objemová procenta) ethanolu. Látka s účinností CSF je stálá také v 0,1% kyselině trifluor octové při pH 2,0 a 0,1% kyselině trifluor octové s 25 % objemovými acetonitrilu.

Jak již bylo uvedeno, bílkovina CSF, získaná způsobem podle vynálezu je určena pro použití k léčbě útlumu dřeně, například při (symptomatické) ⁹granulocytophenii, která může být způsobena léčbou nádorů chemicky nebo ozářením. Mimo to je možno bílkoviny CSF, vyrobené způsobem podle vynálezu použít k léčbě těžkých infekcí. K tomuto použití se užije dávka 200 až 1000 mikrogramů denně. Bílkovina

CSF se s výhodou podává nitrožilně spolu s vhodným farmakologickým nosičem. Příkladem vhodného nosiče může být roztok chloridu sodného a lidský serový albumin v roztoku chloridu sodného.

Mimo to má bílkovina CSF, vyrobená způsobem podle vynálezu ještě další účinky a další použití. Bylo například prokázáno, že CSF myší aktivuje neutrofily. Bylo by možno očekávat, že CSF primátů, získaný způsobem podle vynálezu bude rovněž aktivovat neutrofily. Fyziologické funkce této bílkoviny jsou tedy mnohotvárné. V kostní dřeni může tato látka podporovat vývoj a diferenciaci buněk, které zajišťují obranu, na periferii pak aktivuje nové i existující buňky. Při místní imunologické reakci může CSF způsobit nahromadění nebo nepřítomnost neutrofilů v zanícené oblasti. Nevhodná lokalizace a/nebo aktivace neutrofilů může být jednou z příčin patofyziologie různých poruch imunologického systému, například reumatoidních arthritid.

Vynález bude dále osvětlen v souvislosti s příklady, které jsou určena pouze k osvětlení, nikoliv však k omezení způsobu podle vynálezu a znázorňují, jak je možno prakticky provádět způsob podle vynálezu.

Pokud není uvedeno jinak, jsou všechny teplotní údaje v příkladové části přihlášky uvedeny ve stupních Celsia.

Restrikční endonukleázy jsou užívány za podmínek a způsobem, který je doporučen jejich výrobcem. Reakce, při nichž dochází k vazbě, jsou prováděny podle svrchu uvedené publikace Maniatise a dalších na str. 245 až 6 při použití pufru, který je popsán na str. 246 uvedené publikace a koncentrace DNA v rozmezí 1 až 100 µg/ml při teplotě 23 °C pro DNA se "slepými konci" a 16 °C pro DNA s konci, které se na sebe snadno váží. Elektroforéza se provádí na 0,5 až 1,5% agarozovém gelu s obsahem 90 mM Tris-boritanu a 10 mM EDTA. Všechna DNA, značená radioaktivně je značena 32P.

Pod pojmem "rapid prep" se rozumí rychlá produkce DNA bakteriofágu nebo plasmidu v malém měřítku, tak, jak je popsána například ve svrchu uvedené publikaci Maniatise a dalších na str. 365 až 373.

P ř í k l a d A

Stupeň 1 Linie buněk Mo

Buněk Mo (ATCC CRL 8066) se běžně pěstují na prostředí alfa se 6 % oxidu uhličitého nebo prostředí podle Iscova s 10 % oxidu uhličitého a s obsahem 20 % fetálního telecího sera (FCS), 2 mM glutaminu, 100 jednotek/ml streptomycinu a 100 μ g/ml penicilinu. Buněk je nutno přeočkovávat každé 4 až 5 dnů. Buněk se spočítají a pak se jimi očkují Falconovy T-175 lahve s obsahem 100 až 150 ml živného prostředí při hustotě 3 až 4 $\times 10^5$ buněk/ml. Počet buněk se zdvojnásobí za přítomnosti 20 % FCS za 4 až 7 dnů. Rychlost růstu není stálá a někdy mohou buněk zcela zastavit růst, načež se náhle rychle rozrůstají. Buněk Mo je možno pěstovat také v prostředí, které je prosté séra. Přežívání buněk je mnohem lepší v případě, že se buněk při přenesení z FCS do prostředí, které je séra prosté nepromývají. Optimální hustota v prostředí, které je prosté séra (SF) je 5 $\times 10^5$ buněk/ml. Buněk mírně rostou, nebo alespoň si zachovávají stejný počet buněk po tři dny v prostředí, které je prosté séra, pak je nutno přidat 20 % FCS po dobu alespoň 4 dnů. Toto

růstové schema (3 dny SF), 4 dny 2P% FCS), je možno opakovat každý týden, je-li požadováno prostředí bez séra, a to po několik měsíců bez jakéhokoliv zjevného poškození buněk.

Stupeň 2 Zjišťování účinnosti CSF

A. Stanovení s použitím kostní dřeně

Získá se čerstvá kostní dřeň a odstraní se kostní úlomky, načež se dřeň zředí v poměru 1 : 1 sterilním chloridem sodným s obsahem fosfátového pufru (PBS) při teplotě místnosti a pak se dřeň převrství Ficoll-Paque, přibližně 30 ml BM-PBS a 6 ml Ficollu. Pak se směs odstřeďuje při 1500 otáčkách za minutu 40 minut při teplotě místnosti. Tuk a vrstva PBS se izoluje a odloží. Pak se pipetou odebere zakalená vrstva, která se dvakrát promyje PBS a pak se spočítají buněk, které se pak nanesou do prostředí RPMI (GIBCO, RPMI 1640) s 10% FCS, inaktivovaného tepla, (HIFCS) na 3 hodiny k odstranění lnoucích buněk.

Živé prostředí, které musí být čerstvé, se připraví následujícím způsobem:

20 % FCS

0,3 % agaru, rozpuštěného ve vodě, zchladí se na
40 °C,

2x Iscoves (objemový poměr 1 : 1 v agaru)

1 % P/S konečné koncentrace 100 µg/ml streptomycinu
a 100 jednotek/ml penicilinu

10^{-4} M α -thioglycerolu ve 2x Iscoves ze zásobního
roztoku o koncentraci 10^{-2} M

agar se zchladí na 40 °C a přidají se další složky,
ve vodní lázni se výsledná směs zchladí na 37 - 38 °
a na této teplotě se udržuje.

Po 3 hodinách se buňky, které nelnou
oddělí pipetou a materiál se odstředí a buňky se zno-
vu spočítají. Přidá se 2×10^5 buněk/ml a prostředí
se udržuje na vodní lázni při teplotě 37 - 38 °C. Pak
Pak se přidá vzorek, například prostředí z buněk po
transfekci v množství obvykle 10 mikrolitrů do první
řady vyhloubení mikrotitrační desky ve dvojím prove-
dení. Pak se do každého vyhloubení přidá 100 mikro-
litřů buněčné suspenze a pak ještě dalších 50 mikro-
litřů buněčné suspenze do každého vyhloubení první
řady. Materiál ve vyhloubeních se důkladně promísí
a 50 mikrolitrů roztoku z první řady se přenesse do
následující řady a pak se dále postupuje po celé

plotně, čímž se získá postupné ředění vždy 1 : 3. Plotna za zabalí p do parafilmu a inkubuje 10 až 15⁴ dnů v 10 % oxidu uhličitého při teplotě 37 °C ve vlhkém prostředí, načež se počítají kolony^{ic}.

Spočítá se celé množství kolonií v každém vyhloubení. V každém pokusu se užije několik vyhloubení bez vzorku, čímž se získá základní počet kolonií. Tento počet se odečte od počtu kolonií, které se nacházejí v každém vyhloubení s obsahem vzorku. Jedna jednotka CSF je to množství, které vyvolá tvorbu jedné kolonie nad základní počet kolonií na 10^5 buněk z lidské kostní dřeně v případě, že se užije 10^5 buněk v jednom mililitru, a to v případě, že koncentrace CSF je pod stupněm sycení. Tato koncentrace se stanoví zředěním a srovnáním počtu kolonií při různém ředění tak, aby bylo možno určit koncentraci těsně před hladinou nasycení.

Při tomto stanovení se počítají kolonie, které obsahují granulocyty, monocyty nebo oba typy kolonií. Typ buněk v koloniích se stanoví odebráním kolonie a barvením buněk.

B. Stanovení při použití buněk KG-1

Buněk KG-1, popsané v publikaci Blood, sv. 56, č. 3 (1980) se pěstují v prostředí podle Iscova s 10 % FCS, buněk se přeočkovávají 2x týdně, při každé pasáži se užije 2×10^5 buněk/ml. Buněk se užijí ke stanovení pouze s pasáží 30 až 35. Stanovení je stejné jako při použití buněk kostní dřeně s tím rozdílem, že buněk KG-1 se pěstují v agarové směsi při použití 4×10^3 buněk/ml.

Počet kolonií, které rostou v každém vyhloubení se stanoví po odečtení základního počtu kolonií stejným způsobem jako při použití buněk z kostní dřeně. Jedna jednotka/ml pro tyto buněk při použití CSF je tak koncentrace CSF, která stimuluje polovinu maximálního množství kolonií buněk KG-1 k růstu (nasycení). Maximálního počtu kolonií je možno dosáhnout tak, že se do několika vyhloubení přidá CSF až do nasycení.

Stupeň 3 Konstrukce vektoru p91023(B)

Vektorem, použitým pro transformaci, byl vektor pAdD26SVpA(3), který byl popsán v publikaci Kaufman a další, Mol. Cell Biol. 2 (11) 1304 - 1319 (1982). Tento vektor má strukturu, která je znázorněna na obr. 2. Tento plasmid obsahuje ^{cDNA} gen pro dihydrofolát reduktázy⁴ myši (DHFR), který je pod transkripčním řízením hlavního promotoru adenoviru 2 (Ad2). Do adenoviru se přiřadí sled z genu pro imunoglobulin, který je přítomen mezi promotorem Ad2 a sledem DHFR a mění zakončení 5' a 3'. Místo pro polyadenylaci SV40 se nachází směrem dolů od sledu, který je kódem pro DHFR. Sled tohoto vektoru, který je odvozen od prokaryotických buněk, je vzat z pSV0d (Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y, a Maniatis, T., 1981, Cell 27, 279 - 288) a neobsahuje sledy z pBR322, které způsobují inhibici replikace v buňkách savců, jak bylo popsáno v publikaci Lusky, M., a Botchan, M, 1981, Nature (London) 293, 79 - 81.

Svrchu uvedený ⁴plasmid se převede na plasmid pCVSVL2 způsobem, znázorněným na obr. 2 a na plasmid pAdD26SVpA(3) (d) tak, že se vypustí jedno ze dvou míst pro působení restriční endonukleázy

PstI v původním plasmidu. Tento způsob se uskuteční částečným rozštěpením uvedeným enzymem, čímž je možno získat subpopulaci linerizovaných plasmidů, v nichž je rozštěpeno pouze jedno místo pro působení enzymu PstI, načež se působí Klenowovým fragmentem, který se naváže k recirkulisaci plasmidů, který se pak použije k transformaci *E. coli* a hledají se kolonie, které mají rozštěpeno místo pro působení PstI, které je uloženo poblíž zakončení 3' polyadenylovaného sledu SV40.

Vedoucí sled adenaviřu a geny, získané z virů (VA-geny) se včlení do plasmidu pAdd26SVpA(3) (d) způsobem, znázorněným na obr. 2. Postupuje se tak, že se uvedený vektor rozštěpí enzymem PvuII za získání otevřené lineární molekuly, která se otevírá v blízkosti zakončení 3' prvního ze tří elementů, které tvoří vedoucí sled. Pak se rozštěpí plasmid pJAW 43, popsáný v publikaci Zain a další, 1979, Cell 16 851, působením enzymu XhoI, naváže se Klenowův fragment, materiál se rozštěpí enzymem PvuII a fragment o 140 párech bazí, který obsahuje druhý element a část třetího elementu vedoucího sledu se izoluje elektroforézou na akrylamidovém gelu (6 % v trisborátovém pufru podle svrchu uvedené publikace Maniatis a dalších (1982).

Fragment o 140 párech bazí se pak naváže na plasmid pAdD26SVpA(3) (d) po štěpení enzymem PvuII. Produkt této vazby se užije k transformaci E. coli za vzniku odolnosti tohoto mikroorganismu proti tetracyklinu, kolonie se sledují způsobem podle Grunsteina a Hognesse při použití 32p-značeného vzorku hybridisací na fragment o 140 párech bazí. S kolonií s pozitivní hybridizací se připraví DNA, aby bylo možno zjistit, zda rekonstruované místo pro působení ρ PvuII se nachází na zakončení 5' nebo 3' včleněného fragmentu o 140 párech bazí, čímž je možno ^kprolázat, zda hybridizace je specifická pro druhý nebo třetí element vedoucího sledu z adenoviru. Správná orientace místa pro působení uvedeného enzymu se nachází na 5'-zakončení včleněného sledu o 140 párech bazí. Takto vytvořený plasmid se označuje pTPL a je znázorněn na obr. 2.

Fragment Ava II D SV40 s obsahem podpůrného sledu SV40 se získá tak, že se DNA SV40 štěpí enzymem Ava II, na zakončení se naváže Klenowův fragment po štěpení Pol I, na tyto fragmenty se ještě naváží spojovací sledy za použití enzymu Xho I, pak se materiál štěpí enzymem Xho I při štěpení příslušného místa a čtyři nejdelší fragmenty (D) se izolují elektroforézou na gelu. Takto získané fragmenty se

naváží na plasmid pTPL po štěpení enzymem Xho I, čímž se získá plasmid pCVSVL2-TPL. Orientace fragmentu SV40 D v tomto plasmidu je taková, že promotor SV40 má stejnou orientaci jako hlavní promotor adenoviru.

Aby bylo možno zavést geny, spojené s virem adenoviru (VA) do plasmidu pCVSVL2-TPL, konstruuje se nejprve plasmid pBR322, který obsahuje fragment adenoviru typ 2 Hind III B. DNA adenoviru typu 2 se rozštěpí enzymem Hind III a fragment B se izoluje elektroforézou na gelu. Takto získaný fragment se pak včlení do plasmidu pBR322, který byl předem rozštěpen enzymem Hind III. Po transformaci E. coli za získání odolnosti proti ampicilinu se rekombinantní kmeny vyhledávají tak, aby byl zjištěn kmen s fragmentem Hind III B a orientace tohoto fragmentu se stanoví štěpením restriktčními enzymy. Plasmid pBR322 - Ad Hind III B obsahuje fragment adenoviru typ 2 Hind III B v orientaci, která je znázorněna na obr. 3.

Jak je zřejmé z obr. 3, geny VA je možno získat z plasmidu pBR322-Ad Hind III B štěpením pomocí enzymu Hpa I, po přidání sledů, napomáhajících k vazbě EcoRI s následným štěpením

enzymem Eco R1 s izolací fragmentu o 1,4 kb. Fragment, který má zakončení po štěpení enzymem EcoR1 se pak naváže na místo v plasmidu p³101, které bylo předtím rozštěpeno tímtož enzymem. Po transformaci E. coli HB101 a po selekci klonů odolných proti tetracyklicnu se kolonie podrobí zkoušce na hybridizaci na filtru při použití vzorku DNA, specifické pro geny ³VA. Pak se připraví DNA z klonů s pozitivní hybridizací a tento materiál se podrobí charakterizaci působením restričních endonukleáz. Produktem je plasmid, který se označuje p91023.

Obě místa pro štěpení enzymem EcoR1 v plasmidu p91023 se odstraní, takže se tento plasmid úplně rozštěpí enzymem EcoR1, čímž vzniknou dva fragmenty DNA, z nichž jeden obsahuje přibližně 7Kb a druhý přibližně 1,3 Kb s obsahem ³genů VA. Zakončení obou fragmentů se vyplní při použití Klenowova fragmentu a enzymu PolI, a pak se oba fragmenty, tj. fragment o 1,3 Kb a o Kb znovu spojí. Plasmid p91023 (A), který obsahuje geny VA je podobný plasmidu p91023, avšak do místa pro působení enzymu EcoR1 jsou v obou případech včleněny geny VA, jak je možno prokázat Grundstein~~er~~-Hognessovou analýzou a působením restričních enzymů.

Jediné místo pro působení enzymu PstI v plasmidu p91023(A) se odstraní a nahradí se místem pro působení enzymu EcoRI. Pak se plasmid p91023(A) úplně rozštěpí enzymem PstI, a pak se naváže Klenowův fragment při použití PolI a na zakončení se naváží pomocné sledy tak, aby místo místa pro působení enzymu PstI vzniklo místo pro působení enzymu EcoRI v plasmidu p91023(A). Lineární plasmid p91023(A) s pomocnými sledy k vytvoření místa pro působení enzymu EcoRI se oddělí a úplně se rozštěpí enzymem EcoRI, načež se takto získané fragmenty znovu naváží. Izoluje se plasmid p91023(^B), jeho struktura se identifikuje a je možno prokázat, že běží o strukturu, podobnou plasmidu p91023(A) až na to, že tento plasmid obsahuje místo pro působení enzymu EcoRI místo místa pro působení enzymu PstI.

Bunky
Stupeň 4 Příprava skupiny cDNA

~~Bunky~~ Mo se pěstují 16 až 20 hodin při použití PHA a PMA ke stimulaci produkce lymfokinů. Bunky se pak nanesou na plotny v množství 5×10^5 buněk/ml v prostředí podle Iscova s 20 %

FCS, 0,3 % objemovými PHA a 5 ng/ml TPA. Bunky se oddělí odstředěním. Takto oddělené bunky se znovu uvedou do suspenze ve 20 ml hypotonického pufru pro rozrušení buněk, chlazeného ledem (RSB pufr: 0,01M Tris-HCl, pH 7,4, 0,01M KCl, 0,0015M $MgCl_2$, 1 μ g/ml cyklohexamidu, 50 jednotek/ml ⁱⁿRNA~~se~~ a 5mM dithiothreitolu). Bunky se nechají nabobtnat na ledu 5 minut, načež se mechanicky rozruší ve skleněném homogenizátoru deseti zdvihy těsně lnoucího pístu. Homogenát se pak odstředí při 2000 otáčkách za minutu (odstředivka Beckman J6) k odstranění jader a nerozrušených buněk. Supernatant se uloží v ledu a jádra se znovu uvedou do suspenze v 10 ml RSB a pak se tento materiál znovu odstředí při malé rychlosti. Tento druhý supernatant se spojí s prvním supernatantem a získaný materiál se znovu odstředí při malé rychlosti k odstranění zbylých jader a nerozrušených buněk. Supernatant v tomto případě se smísí přidáváním 2M KCl až na koncentraci 0,15M KCl a pak se znovu odstředí 30 minut při 25 000 otáčkách za minutu (rotor Beckman Sw 28), čímž se jako segment získají buněčné membrány. Sediment buněčných membrán se opatrně promyje chladným RSB a pak se znovu uvede do suspenze ve 12 ml RSB s obsahem 2M sacharosy a 0,15M chloridu draselného.

Pak se ve zkumavkách do odstředivky (Beckman/ SW41) připraví diskontinuální gradient, tak, že se převrství 6 ml roztoku membrány ve 2M sacharose na 2 ml RSB s 2,5M sacharosy a 0,15M KCl. Zkumavky se doplní 2,5 ml RSB s obsahem 1,3M sacharosy a 0,15M KCl. Tyto gradienty se pak odstředí 4 hodiny při 27 000 otáčkách za minutu (Beckman, rotor SW41) při teplotě 4 °C. Vrstva membrány, která se nachází na rozhraní mezi koncentrací 2,0M a 1,3M sacharosy se opatrně odstraní se strany při použití injekční stříkačky a jehly č. 18. Frakce membrány z obou gradientů se slíjí a zředí jedním objemem destilované vody, načež se přidá do koncentrace 0,5 % Triton X-100 a do koncentrace 0,5 % deoxycholát sodný, načež se materiál extrahuje stejným objemem fenolu. Vodná vrstva se pak znovu extrahuje směsí fenolu a chloroformu v poměru 1 : 1 a nakonec stejným objemem chloroformu. Pak se RNA, vázaná na membránu vysráží přidáním chloridu sodného do koncentrací 0,25M a 2,5 objemů chladného ethanolu, načež se směs inkubuje přes noc při teplotě -20 °C. Vysrážená RNA se oddělí odstředěním 10 minut při 4000 otáčkách za minutu (odstředivka Beckman J-6) a pak se materiál znovu uvede do suspenze v 1 ml destilované vody. Z množství 2×10^9 buněk se získá přibližně 1 mg RNA. Pak se izoluje s celkového množství

RNA příslušné množství mRNA chromatografič na sloupci s obsahem 0,5 ml oligo dT-celulozy. Pak se RNA zahřeje na 5 minut na teplotu 70 °C, rychle se zchladí v ledu a pak se 5x ředí při teplotě místnosti pufr pro vazbu, který obsahuje 0,5M LiCl, 0,01M Tris-HCl, o pH 7,4, 0,002M EDTA a 0,1 % SDS. RNA v tomto pufru se pak nechá projít sloupcem oligo dT-celulozy v rovnovážném stavu ve stejném pufru při teplotě místnosti. Sloupec se promyje 5 ml pufru pro vazbu a pak 5 µl 0,15M LiCl, 0,01M Tris-HCl o pH 7,4, 0,002M EDTA, a 0,1 % SDS. Nakonec se mRNA vymývá při použití 2 ml 0,01M Tris-HCl o pH 7,4, 0,002M EDTA a 0,1 SDS. Pak se mRNA vysráží přidáním chloridu sodného do koncentrace 0,25M a 2,5 objemu ethanolu a směs se inkubuje přes noc při teplotě -20 °C. Vysrážená mRNA se oddělí odstředěním 30 minut při 30 000 otáčkách za minutu (rotor Beckman SW55). Supernatant se opatrně slije a peleta mRNA a znovu uvede v suspenzi v 50 ml vody. Tato suspenze se pak upraví na koncentraci 0,25M chloridu sodného a pak se extrahuje směsí fenolu a chloroformu v poměru 1 : 1 a pak třikrát chloroformem. Pak se mRNA vysráží přidáním 2,5 objemu ethanolu. Směs se několikrát zmrazí a nechá roztát v lázni se suchým ledem a ethanolem a pak se 15 minut odstře-

duje v Eppendorfově odstředivce. Supernatant se opatrně slije a peleta mRNA se znovu uvede do suspenze ve 20 μ l destilované vody. Konečný výtěžek je přibližně 30 μ g mRNA.

První řetězec cDNA se připraví při použití standardních metod. Postupuje se tak, že se 10 μ g mRNA z membrán zředí 100 μ l směsi pro vznik cDNA, která obsahuje 300 mmol Tris o pH 8,4, 140 mmol KCl, 10 mmol $MgCl_2$, 10 mmol β -merkaptoethanolu, 500 μ M dATP, dGTP, dCTP a dTTP, 5 μ g oligo-dT (fosforylované při průměrném rozměru 12 - 18), dále 150 μ Ci 32P dCTP (400 Ci/mmol) a 20 jednotek inhibitoru ribonukleázy RNAsin. Reakce se spustí přidáním 100 jednotek reversní transkriptázy při inkubaci 30 minut při teplotě 42 $^{\circ}$ C. Pak se reakce zastaví přidáním EDTA γ do koncentrace 40 mmol a pak se RNA rozloží inkubací 20 minut v 65 $^{\circ}$ C v 0,2M hydroxidu dosného. Pak se baze neutralizuje přidáním 20 μ l 2M Tris o pH 7,4. Reakční směs se pak extrahuje směsí fenolu a chloroformu a pak se provádí zpětná extrakce při použití 50 μ l 10 mmol Tris o pH 7,5, 1 mmol EDTA (TE) a vodné fáze se slijí. Pak se cDNA s jednoduchým řetězcem převede na cDNA s dvojitým řetězcem tak, že se směs inkubuje 12 hodin při teplotě 16 $^{\circ}$ C spolu se

40 jednotkami Klenowova fragmentu za přítomnosti DNA-polymerázy I ve 100 μ l reakčního prostředí, které obsahuje roztok 50 mmol fosforečnanu draselného o pH 7,4, 2,3 mmol DTT, 2-merkaptoethanol, 10 mmol MgCl_2 , vždy 150 μ mol jednoho ze čtyř deoxynukleotidtrifosfátů a 25 μCi ^{32}P dCTP. Reakce se pak zastaví extrakcí směsí fenolu a chloroformu a nevčleněné trifosfáty se odstraní průchodem vodné p fáze přes sloupec prostředku Sephadex-G-50 o objemu 1 ml. Vyloučené frakce se slijí a vysráží se ethanolem.

Peleta cDNA se promyje chladným ethanolem a pak se znovu uvede do suspenze v 200 μ l 20mmol ~~xxx~~ Tris o pH 8,0, 1 mmol EDTA, 80 μ mol S-adenosylmethioninu a 300 jednotek EcoRI-methylázy na 60 minut při teplotě 37 $^{\circ}\text{C}$. Reakce se zastaví extrakcí směsí fenolu a chloroformu a methylovaná cDNA se izoluje vysrážením ethanolem.

Peleta cDNA se promyje 70% ethanolem a pak se znovu uvede do suspenze ve 200 μ l pufru S1 (Maniatis a další) a materiál se inkubuje s 200 jednotkami S1-nukleázy při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$ celkem 30 minut. Pak se reakce zastaví extrakcí směsí fenolu a chloroformu a cDNA se izoluje vysrážením ethanolem.

Zakončení cDNA s dvojitým řetězcem

se vyční inkubací ve 100 μ l 20 mmol Tris o pH 7,4, 50 mmol chloridu sodného, 10 mmol 2-markaptoethanolu a 500 μ mol všech čtyř deoxynukleotidtrifosfátu s 25 jednotkami Klenowova fragmentu při teplotě místnosti 30 minut. Reakce se zastaví extrakcí směsí fenolu a chloroformu a cDNA se izoluje vysrážením ethanolom.

Takto získané cDNA se podrobí vazbě v 50 μ l pufru s obsahem T4-ligázy (Maniatis a další) za přítomnosti 500 pMol vazných řetězců R1 se sledem pCGGAATTCCG (New England Biolabs) při použití 2000 jednotek T4-ligázy přes noc při teplotě 16 °C. Reakce se zastaví inkubací při teplotě 70 °C po dobu 20 minut, pak se reakční směs zředí na 300 mikrolitrů, takže konečná koncentrace solí je 0,1 mol NaCl, 10 mmol MgCl₂, 50 mmol Tris-HCl o pH 7,4. Pak se cDNA štěpí 2 minuty při teplotě 37 °C působením 700 jednotek enzymu EcoRI. Reakce se zastaví extrakcí směsí fenolu a chloroformu a cDNA se izoluje vysrážením ethanolom. Získaná peleta se znovu uvede do suspence v 50 μ l TE a pak se nechá projít sloupcem s obsahem 5 ml Cl-4B. Získané frakce se slijí a vysráží se ethanolom. Vysrážená cDNA se podrobí elektroforéze

na 1% agarosovém gelu v Tris-acetátovém pufru za přítomnosti 1 μ g/ml ethidiumbromidu. Pak se cDNA o rozměru 500 až 4000 párů bazí izoluje z gelu při použití standardního postupu. Vyloučená cDNA se extrahuje směsí fenolu a chloroformu, vysráží se ethanolem a peleta (po opláchnutí ethanolem) se znovu uvede do suspenze v 50 μ l TE. Konečný výtěžek byl 10 až 500 ng cDNA.

Dále bude popsána příprava vektoru pro expresi p91023(B). 500ng vektoru, rozštěpeného enzymem EcoRI a zpracovaného působením fosfatázy se podrobí vazbě se 100 ng cDNA ve 100 μ l reakčního prostředí (standardní prostředí pro působení T4-ligázy) přes noc při teplotě 16 °C. Reakce se zastaví extrakcí směsí fenolu a chloroformu a pak se navázaná cDNA oddělí vysrážením ethanolem po přidání 5 μ g tRNA jako nosiče.

DNA, vysrážená ethanolem se promyje 70% ethanolem a pak se znovu uvede do suspenze ve 100 μ l TE. Tato DNA se pak užije v podílech o objemu 4 μ l k transformaci E. coli MC1061 (4 μ l pro transformaci v objemu 100 μ l. Každá z 25 transformovaných zkoušek se rozetře na Petriho misku o průměru 150 mm s obsahem 1 % agaru, v L-prostředí

s 10 g/ml tetracyklinu (Tet-plotna) a plotny se inkubují přes noc při teplotě 37 °C. Na každé plotně se vyvine přibližně 2000 kolonií, výsledkem je tedy celkem přibližně 50 000 kolonií. Každá z těchto kolonií má průměr přibližně 0,5 mm. Každá z těchto kolonií se přenese na mikrocelulózový kotouč o průměru 137 mm tak, že se na povrch agaru opatrně uloží suchý filtr, který se pak opatrně sejme. Všechny kolonie zůstanou na filtru, který se pak uloží koloniemi směrem vzhůru na čerstvou Tet-plotnu. Kolonie se nechají růst několik hodin a pak se znovu rozdělí tak, že se přesně na původní filtr uloží čerstvý zvlhčený filtr, filtry se k sobě přitlačí, pak se oddělí a každý filtr se uloží na čerstvou Tet-plotnu a plotny se inkubují přes noc při teplotě 37 °C. Každá kopie se pečlivě označí, aby bylo možno uložení kolonií přesně srovnat s jejich uložení na původním filtru.

Stupěň 5 Příprava směsi plasmidové DNA

Každá z 25 kopií filtrů se opatrně rozřeže skalpelem na osminy, přičemž se zaznamená orientace každé z těchto osmi ve srovnání s původním

filtrem. Z každého úseku se kolonie sejmu do 10 ml L-bujonu. Bakterie se oddělí odstředěním 10 minut při 3000 otáčkách za minutu (odstředivka Beckman J-6) a pak se znovu uvedou do suspenze v 0,6 ml 25% sacharózy s 50 M Tris-HCl o pH 8,5 a změní se na protoplasty přidáním 0,2 ml lysozymu o koncentraci 5 mg/ml a s následnou inkubací v ledu na dobu 5 až 10 minut. Protoplasty se pak inkubují při teplotě místnosti 10 minut, přidá se 0,125 ml EDTA o koncentraci 0,5 molů a pak se buňky rozruší přidáním 0,12 ml 10% SDS v 50 mmol Tris-HCl o pH 8,0. Rozrušený materiál se opatrně promíchá, inkubuje se 15 minut při teplotě místnosti a pak se DNA bílkovin a chromosomů vysráží přidáním 0,3 ml 5M NaCl. Po inkubaci v ledu na dobu 15 minut se materiál odstředí na Eppendoffově odstředivce 30 minut za chlazení. Supernatant se opatrně odstraní, čímž se získá viskózní peleta DNA a bílkoviny, která se zředí přidáním 2,5 ml vody. Směs se extrahuje 1 ml fenolu, vrstvy se oddělí odstředěním (10K po dobu 10 minut, rotor Sorvall SS-34) a vodná vrstva se oddělí do nové zkumavky. DNA se vysráží přidáním 0,5 ml 5M ~~NaCl~~ NaCl a 7,5 ml chladného ethanolu a směs se několikrát zmrazí v lázni ethanolu a suchého ledu. Vysrážený materiál se oddělí odstředěním (10K, 15 minut, Sorvall SS-34), znovu se uvede do suspenze

v 0,3 ml 0,3M octanu Na^+ sodného a znovu se vysráží (v Eppendorfově zkumavce) přidáním 1 ml ethanolu. Po 10 až 15 minutách v lázni se suchým ledem a ethanolom se vysrážená DNA oddělí odstředěním (5 minut v Eppendorfově odstředivce) a výsledná peleta se znovu uvede do suspenze ve 100 μ l sterilního prostředí TE (10 mmol Tris o pH 8, 1 mmol EDTA). Z typické zkoušky se získá 5 až 10 μ g ~~ng~~ plasmidové DNA. Každý vzorek obsahuje DNA z 200 až 500 kolonií původního filtru. Z 25 filtrů se připraví celkem 200 vzorků DNA.

Stupěň 6 Isolace klonů CSF

Každý ze vzorků DNA ze stupně 5 se odděleně přenese do opičích buněk, M6 tak, jak bude dále popsáno.

Bunky M6 se běžně pěstují na modifikovaném Eaglově prostředí (Dulbecco, DME je možno získat od Gibco) s obsahem 10 % fetálního telecího séra, inaktivovaného teplem (HIFCS), buňky se dvakrát týdně přeočkovávají při ředění 1 : 6. 24 hodin po dělení v poměru 1 : 6 jsou buňky M6 připravené pro transfekci. 24 hodin před transfekcí se

$1,2 \times 10^8$ buněk M6 naočkuje na plotnu (Cell Factory, Nunc) v 1,5 l prostředí DME + 10 % HIFCS. Těsně před transfekcí se plotny 2x promyjí 7 ml DME bez sera.(SF). DNA se rozpustí v 0,1 M Tris o pH 7,3 a přidá se k prostředí DME, které obsahuje 2mmol glutaminu, 100 μ g/ml streptomycinu, 100 jednotek/ml penicilinu a 0,20 mg/ml DEAE-dextranu, doplněno na 4 ml Tris-DNA roztokem. 4 ml prostředí s obsahem rozpuštěné DNA se přidají k plotně s obsahem buněk M6 COS a buňky se 12 hodin inkubují.

Po inkubaci se buňky jednou nebo dvakrát promyjí 7 ml SF DME. Pak se 5 ml DME s 10 % HIFCS, 100 jednotek/ml penicilinu, 100 μ g/ml streptomycinu, 2 mmol glutaminu a 0,1 mmol chlorochinu přidá ke směsi a buňky se pak inkubují po dobu 2 1/2 hodiny.

Po inkubaci se buňky promyjí SF DME a přidá se 10 ml DME + 10 % HIFCS na plotny. Po 30 hodinách se prostředí odsaje a přidá se 4 ml DME + 10 % HIFCS na plotnu. Buňky se izolují odstraněním prostředí po 24 až 26 h hodinách další inkubace.

Prostředí z každého vzorku se zkoumá na účinnost CSF při použití zkoušky KG-1. Pro každý vzorek, jehož účinnost CSF je pozitivní, je nutno

vyhledat klon na původním filtru, který je příčinou této účinnosti. Například v případě pozitivní transfekce účinnosti CSF se odeberou všechny kolonie původního úseku filtru, na němž byla nalezena tato účinnost. Jde obvykle o přibližně 320 kolonií, které se odeberou do 3 ml L-prostředí s 10 μ g/ml tetracyklinu. Kultury se pěstují přes noc. 320 kolonií se uloží do matrice 18 x 18. Z horizontálních řad a vertikálních sloupců matrice se připraví směsi (36 směsí, poslední horizontální řada měla pouze 14 klonů). Vzorky DNA se připraví z každé směsi a užijí se k ^{tr}transfekci buněk (CDS). Supernatanty z takto získaného materiálu se zkouší na účinnost. Byly získány dvě pozitivní zkoušky, jedna ve vertikálním sloupci, druhá v horizontální řadě. Kultury, společně oběma směsím obsahovala klon s účinností CSF.

Z kultury bylo izolováno celkem dvanáct jednotlivých klonů a miniprep DNA pak byla připravena z kultur o objemu 10 ml v L-prostředí, tak, jak bylo popsáno svrchu. Pak byly rozštěpeny vzorky 10 μ l DNA z těchto zkoušek enzymem EcoRI a výsledné fragmenty DNA byly analyzovány elektroforézou na agarozovém gelu. Devět z dvanácti klonů mělo společný včleněný sled o přibližně 750 párů

bazí. DNA ze čtyř z těchto klonů a ze zbývajících tří klonů byla přenesena do buněk M6 COS svrchu uvedeným způsobem. Supernatanty z takto provedených transfekcí byly zkoumány zkouškou KG-1 stejně jako zkouškou s použitím ~~xxxx~~ buněk z kostní dřeně na účinnost CSF. Čtyři klony měly 750 párů bazí jako společný fragment, včleněný ve správném sledu, takže docházelo k expresi buněk M6 COS ve vysokém stupni, jak bylo možno prokázat účinností CSF v obou uvedených zkouškách na rozdíl od zbývajících tří klonů. Znamená to, že kódová oblast pro CSF musí být uložena ve včleněném sledu o 750 párech bazí.

Sled DNA, který je kódem pro CSF byl odstraněn z vektoru pro transformaci v pozitivním klonu rozštěpením enzymem EcoR1 a jeho sled byl stanoven při použití standardní metody po podrobení fragmentů klonování ~~f~~ ve vektorech M13, čímž byl prokázán sled, znázorněný na obr. 1. Plasmid p91023(B) - CSF, o němž bylo poprvé prokázáno, že řídí expresi CSF v buňkách COS byl pak označen pCSF-1. Tento plasmid byl pak uložen ve sbírce American Type Culture Collection ~~xxxxxxxxxxxx~~ v kmenu E. coli MC1061 pod číslem ATCC 39754 2. července 1984.

Stupěň 7 Expresse bílkoviny CSF

Opičí buňky M6 COS, transformované vektorem p91023(B) s obsahem CSF/cDNA, tak, jak byl tento materiál izolován ve stupni 6, se pěstují způsobem popsaným ve stupni 6, čímž dochází k produkci bílkoviny CSF, která se pak nachází v živném prostředí.

Postupuje se tak, že se ~~jm~~ 1 mg této DNA (pCSF-1) rozpustí v 1 ml 0,1 M Tris o pH 7,3 a přidá se k 600 ml DME s obsahem 2 mmol glutaminu, 100 jednotek/ml streptomycinu, 100 ^u/ml penicilinu (P/S) a 0,25 mg/ml DEAE Dextranu s molekulovou hmotností 500 000 (Pharmacia). 600 ml roztoku DNA DEAE dextranu se přidá k buňkám M6 COS a směs se inkubuje 12 hodin při teplotě 37 °C. Po inkubaci se buňky promyjí 900 ml SF DME a pak se inkubují 2,5 hodin v 600 ml DNA s obsahem 0,1 mmol chlorochinu, 10 % HIFCS, 2 mmol glutaminu a P/S. Prostředí s obsahem chlor^ochinu se odstraní odsáváním, buňky se promyjí SF DME a pak se přidá 1500 ml DME s 10 % HIFCS. Po 30 hodinách se buňky promyjí SF DME, prostředí se nahradí 800 ml čerstvého prostředí SF DME a pak se buňky pro transfekci inkubují 24 hodin při

teplotě 37 °C. Prostředí se pak odsaje a nahradí 800 ml čerstvého prostředí SF DME. Bunky se pak inkubují v tomto prostředí 24 hodin, načež se prostředí odstraní. Jakmile je to možné, zahustí se vzorky prostředí 20x ultrafiltrací pod tlakem při použití komory Amicon o objemu 2,5 l s membránou YM5, která odděluje sloučeniny do molekulové hmotnosti 5 000.

Stupěň 8 Čištění rekombinantního CSF

200 ml koncentrovaného prostředí ze 4 l výchozího materiálu ze stupně 7 se na 30 % nasytí síranem amonným přidáním pevného síranu amonného a vysrážená bílkovina se oddělí odstředěním. Supernatant se na 80 % nasytí síranem amonným přidáním dalšího pevného síranu amonného a vysrážená bílkovina se opět oddělí odstředěním. Peleta se znovu uvede do suspenze v 5 ml 20 mmol citronanu sodného o pH 6,1 s obsahem 1 M NaCl. Rozpuštěná bílkovina se nanese na sloupec o rozměrech 1,6 x 100 cm s náplní Ultrogel AcA54 v rovnovážném stavu ve stejném pufru. Účinnost CSF se vymývá ze sloupce při molekulové hmotnosti 19 k jednotek nebo přibližně po 90 ml

počátečního eluátu. Bylo pozorováno, že v případě, že se filtrace na gelu provádí při malé iontové síle, vymývá se látka s účinností CSF ze sloupce ve dvou polohách s molekulovou hmotností 19 a 38 k jednotek, což patrně znamená tvorbu dimerů. Účinné frakce se spojí a přidává se 10% TFA do koncentrace 0,15 % a pak se materiál nanese na sloupec prostředku Vydac C4 rozměru 0,46 x 25 cm v rovnovážném stavu v 0,1% TFA. Sloupec se vyvíjí lineárním gradientem acetonitrilu od 0 do 90 % v 0,1% TFA rychlostí 1 ml za minutu při celkovém množství 340 ml. Účinnost CSF se vymývá mezi 39 a 43 % acetonitrilu, frakce 16 až 20. Vzorek frakce 19 o objemu 20 μ l byl analyzován elektroforézou na SDS polyakrylamidovém gelu (13,5% gel podle publikace Lammlí, Nature 227, 680 (1970)). Bylo možno pozorovat jediný široký pás pro bílkovinu s molekulovou hmotností 18 až 26 k jednotek. Poněkud širší rozmezí pro molekulovou hmotnost CSF je běžnou vlastností glykoproteinů a patrně odráží velké, avšak měnící se množství uhlohydrátu. Bílkovina z frakce 19 byla podrobena Edmanově degradaci při použití zařízení pro stanovení sledu. Z přibližně 20 μ g bílkoviny bylo možno určit sled prvních šestnácti aminokyselin jako A-P-A-R-S-P-S-P-S-T-Q-P-W-E-H. Vysoký výtěžek tohoto jediného sledu napovídá,

že bílkovina CSF z frakce 19 byla vyčištěna až do homogenity. Biologická zkouška prokázala, že frakce 19 obsahovala 3×10^7 jednotek na jednotku absorban-
ce A_{280} . Protože typické bílkoviny ve vodném rozto-
ku mají extinkční koeficient 0,8 až 1,2 jednotek
absorbance A_{280}^0 . Na 1 mg bílkoviny, specifická účín-
nost čištěného CSF je v rozmezí 1×10^7 až 4×10^7
jednotek/mg v případě, že se užije zkoušky s bun-
kami z lidské kostní dřeně.

P ř í k l a d B

Klonování CSF Gibbona

Stupeň 1 Příprava mRNA z T-buněk Gibbona

Vzorek linie T-buněk Gibbona, ozna-
čený UCD-MLA 144 se pěstuje několik týdnů v prostře-
dí RPMI 1640 (Gibco) a 20% fetálním telecím seru (FCS)
až do získání počtu 1×10^9 buněk. Tyto buňky byly
zpracovávány tak, že byla indukována produkce vysoké
hladiny CSF aktivací po 24 hodiny působením 10 ng/ml
12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetátu (TPA v RPMI 1640

s 1 % FCS. Pak byly buněk izolovány odstředěním 5 minut při 1000 otáčkách za minutu, byly promyty chloridem sodným s fosfátovým pufrém (PBS) a pak byly opět izolovány odstředěním.

Z těchto buněk byla připravena mRNA polysomů, vázaných na membránu (MBP) způsobem, popsaným v příkladu A pro přípravu RNA z buněk Mo.

Stupěň 2 Reakce s cDNA prvního řetězce

6 μ g MBP mRNA ze stupně 1 se zředí v reakční směsi pro přípravu cDNA v množství 50 μ l, stejně jako bylo popsáno ve stupni 4 příkladu A a reakce se započne přidáním reversní transkriptázy. Směs se inkubuje 30 minut při teplotě 42 °C, pak se reakce zastaví přidáním EDTA do koncentrace 50 mmol a směs se zředí vodou na 100 μ l. Pak se směs extrahuje nejprve směsí fenolu a chloroformu a pak chloroformem. Hybridy cDNA/RNA se oddělí od nevčleněných trifosfátů chromatografií na sloupci s obsahem 2 ml Sepharose CL-4B. Vyloučené frakce se slíjí a hybridy se vysráží ethanolem, výtěžek je 570 ng.

Pak se 10 ng cDNA s takto upraveným zakončením spojí s 50 ng plasmidu pBR322 se zakončeními G (NEN) v 10 μ l 10 mmol Tris o pH 7,5, 1 mmol EDTA a 100 mmol chloridu sodného. Výsledná reakční směs se inkubuje 10 minut při teplotě 68 °C a pak ještě 2 hodiny při teplotě 57 °C.

Stupěň 5 Transformace bakterií

Kmen E. coli MC1061 se pěstuje v L-bujonu, pak se zchladí v ledu, buňky se ~~pakylují~~ oddělí odstředěním a přidá se chlorid vápenatý k přípravě buněk pro transformaci. Pak se 5 μ l roz-toku ze stupně 4 inkubuje s 200 μ l takto připrave-ných bakterií. Tato transformace se opakuje 15x při použití veškerého množství cDNA z předchozího stupně a materiál se nanese na plotny o průměru 15 cm s 1% agarem v L-bujonu s obsahem 10 μ g/ml tetracykli-nu. Na každé plotně vyrostlo přibližně 1000 kolonií.

Stupěň 6 Pěstování kopií

10 000 kolonií z transformací se jednotlivě vyjmou, přenesou se na čerstvé plotny

Stupen 3 Reakce s cDNA druhého řetězce

Pelleta cDNA prvního řetězce ze stupně 2 se znovu uvede v suspenzi v 50 ml vody a provádí se syntéza druhého řetězce ve standardní reakční směsi při použití polymerázy I *E. coli*, ligázy *E. coli* a ribonukleázy H. Reakční směs se inkubuje přes noc při teplotě 16°C a pak hodinu při teplotě 37 °C. Reakce se zastaví přidáním EDTA a směs se extrahuje směsí fenolu a chloroformu. Pak se cDNA oddělí od nevčleněných trifosfátů chromatografií na sloupci prostředku Sepharosa CL-4B, získané frakce se slijí a cDNA se izoluje vysrážením etanolem.

Stupen 4 Příprava rekombinantní cDNA

Pelleta cDNA ze stupně 3 se uvede znovu do suspenze v 75 μ l vody. Pak se přidají na konce cDNA homopolymerní zakončení tak, že se přidá 10 μ l roztoku cDNA k 25 μ l standardní reakční směsi s obsahem terminální transferázy a výsledná směs se inkubuje 5 minut při teplotě 30 °C. Reakce se zastaví přidáním EDTA do koncentrace 40 mmol a pak se směs inaktivuje teplem 10 minut při teplotě 68 °C.

minut při teplotě 37 °C se směs smísí s 1/ul 10 x T4 pufru s DNA polymerazou, přidá se ještě 1 /ul 2 mmol roztoku dCTP, dTTP, dGTP a 10/ul ^{32}P dATP (10/uCi/ul, 3000 Ci/mmol) a 3 jednotky Tr DNA polymerázy. Pak se reakční směs inkubuje 20 minut při teplotě 37 °C, přidá se 1/ul 2 mmol dATP a reakční směs se inkubuje ještě 10 minut při teplotě 37 °C.

Nevčleněné trifosfáty se oddělí od značené cDNA chromatografií na sloupci prostředku Sephadex G100. Pak se připraví druhý vzorek ze syntetického oligonukleotidu se sledem

ATC TGG CTG CAC AG

který je komplementární k zakončení oblasti, která je kódem pro CSF na té části, na níž se nachází aminoskupina. Tento oligonukleotid byl označen ^{32}p dATP na 5'-zakončení při použití standardní reakce s polynukleotidkinásou.

Stupeň 8 Isolace klonů $\overline{\text{CSF}}$ cDNA

Při zkouškách na standardní hybridizaci bylo možno prokázat tuto hybridizaci u 45 klonů při použití pCSF-1 cDNA, označené T4. Z těchto klonů

v množství 500 kolonií na plotnu v mřížce a kolonie se pěstují přes noc při teplotě 37 °C. Pak se kolonie oddělí od ploten přitlačením filtru ze suché mikrocelulózy na povrch plotny. Z každého základního filtru se připraví dvě kopie. Původní filtry se skladují při teplotě 4 °C a na kopie se působí zásadou a pak se za tepla suší, aby byly připraveny pro hybridizaci.

Stupeň 7 Příprava hybridizačních vzorků, značených ^{32}P

Včleněný sled cDNA z pCSF-1 byl izolován rozštěpením restrikním enzymem EcoRI s následnou elektroforézou na agarozovém gelu při použití Tris acetátového pufru a ethidiumbromidu. Pás, obsahující fragment cDNA byl z gelu vyříznut a čištěn obvyklým způsobem.

300 ng fragmentu cDNA bylo pak přidáno k 1 μl 10 x $\times$ pufru pro působení T4 DNA polymerázy (0,33 M Trisacetát o pH 7,9, 0,66 M octan draselný, 0,1 M octan hořečnatý a 10 mmol dithiothreitolu) s 3 jednotkami T4 DNA polymerázy (New England Biolabs) a směs se zředí vodou na 10 μl . Po inkubaci 5 až 10

nut při 1000 otáčkách za minutu, pak byly promyty chloridem sodným s obsahem fosfátového pufru ~~KH₂PO₄~~ (PBS) a nakonec byly buňky odděleny odstředěním.

Pak byla připravena cytoplasmatická RNA opatrným rozrušením buněk tak, že buňky byly uvedeny do suspenze v 50 ml chladného pufru pro rozrušení buněk s obsahem Tritonu (pufr sestával ze 140 mmol NaCl, 1,5 mmol MgCl₂, 10 mmol Tris o pH 8,6 a 0,5 % Triton X-100) s 10 mmol dithiothreitolu (DTT) a 50 jednotkami/ml RNA sin (Bibtec). Materiál byl rozdělen na dvě stejné části a každá z těchto částí byla navrstvena na 10 ml tého pufru s obsahem 20 % sacharosy. Buněčná jádra byla odstraněna odstředěním při teplotě 4 °C po dobu 5 minut při 400 otáčkách za minutu. Horní vrstva, kterou tvořil cytoplasmatický extrakt byla opatrně odstraněna a byl přidán dodecylsulfát sodný (SDS) do konečné koncentrace 1 %. Pak byl roztok 2x extrahován týž objemem směsi fenolu a chloroformu v poměru 1 : 1 a RNA byla vysrážena přidáním 2,5 objemu chladného ethanolu. Vysrážená RNA byla oddělena odstředěním 15 minut při 4000 otáčkách za minutu a pak bylo znovu uvedeno do suspenze ve směsi 0,01 M Tris o pH 7,5, 1 mmol EDTA, 0,25 M NaCl (pufr TE s 0,25 M NaCl) a materiál byl znovu

hybridizovalo přibližně 20 klonů se vzorkem, který obsahoval značený oligonukleotid. Kódová oblast jednoho z těchto klonů byla podrobena analýze sledu, přičemž bylo zjištěno, že došlo k substituci většího počtu bazí, některé tyto substituce vedly k rozdílným aminokyselinám v bílkovině, k jejíž expresi došlo. Prokázané rozdíly jsou znázorněny na obr. 1 nad sledem DNA pro gen lidského CSF, tak, jak byl klonován v příkladu A.

P ř í k l a d C

Klonování CSF z mRNA lymfocytů z periferní krve

Stupeň 1 Příprava mRNA z lymfocytů z periferní krve

Lymfocyty z periferní krve byly připraveny z vedlejších produktů při výrobě plasmy (poskytl Červený kříž) frakcionací při použití gradientu Ficoll-Hypaque. Bylo získáno při pěstování v prostředí RPMI-1640 za přítomnosti 5 % fetálního telecího sera, 0,17 % fytohemmaglutinu a 10 ng/ml PMA hustoty 2×10^6 buněk/ml celkem bylo získáno 6×10^9 buněk. Buněky byly odděleny odstředěním 5 mi-

vysrážen přidáním 2,5 objemu chladného ethanolu. Nakonec byla RNA oddělena odstředěním a znovu uvedena do suspenze v 5 ml vody. Celkový výtěžek byl 7,5 mg.

oligo

Z celkové cytoplasmatické RNA byla izolována mRNA selekcí na ^{ol}oligo dT celulóze. Pak se 2,5 mg veškeré RNA zahřeje na 5 minut na teplotu 65 °C. Přidá se chlorid sodný do koncentrace 0,5 M a RNA se nechá zchladnout na teplotu místnosti a pak se nechá projít sloupcem s obsahem 1 ml oligo dT celulózy v rovnovážném stavu v TE + 0,5 M chloridu sodného (pufr pro vazbu). Nenavázaná RNA se oddělí důkladným promytím sloupce tímtež puforem. Vázaná mRNA se pak vymývá 3 ml vody a vysráží se přidáním 0,2 ml 4 M chloridu sodného a 2,5 objemu chladného ethanolu. Vysrážená mRNA se oddělí odstředěním 30 minut při 25 000 otáčkách za minutu. Výsledná usazenina v množství přibližně 100 µg se znovu uvede do suspenze v 50 µl vody.

Stupeň 2 Reakce s prvním řetězcem cDNA

20 µg PBL mRNA se zředí v reakční směsi s obsahem 50 µm cDNA, která obsahuje 100 mmol

Tris o pH 8,4, 140 mmol KCl, 10 mmol $MgCl_2$, 10 mmol 2-merkapttoethanolu, 400 μ mol dATP, dGTP, dCTP a dTTP, 5 μ g oligo-dT s průměrnou velikostí 12 - 18 a 25 μ Ci ^{32}P dCTP (400 μ Ci/mmol) a 20 jednotek inhibitoru ribonukleázy RNAsin. Reakce byla spuštěna přidáním 60 jednotek reversní transkriptázy při teplotě 37 °C s následnou inkubací 30 minut při teplotě 42 °C.

Reakce pak byla zastavena přidáním EDTA do koncentrace 40 mmol s následnou extrakcí stejným objemem fenolu, nasyceného vodou. Fenolová fáze byla podrobená zpětné extrakci 50 μ mmol pufru TE. Vodné fáze byly slity a hybridy cDNA/RNA byly izolovány od nevčleněných trifosfátů tak, že slité vodné fáze prošly sloupcem s obsahem 5 ml prostředku Sepharose CL-4B (Sigma) v rovnovážném stavu s TE. Frakce, které prošly sloupcem, byly slity, doplněny na obsah 250 mmol chloridu sodného a nukleové kyseliny byly vysráženy přidáním 2,5 objemů chladného ethanolu. Hybridy byly odstředěny 30 minut při 40 000 otáčkách za minutu. Výsledná usazenina 2,5 μ g cDNA byla znovu uvedena do suspenze v 50 μ l vody.

Stupeň 3 Reakce s druhým řetězcem cDNA

Druhý řetězec cDNA byl syntetizován současným působením enzymu DNA polymerazy I, DNA ligázy a RNAázy H z E. coli. 50 μ l takto získané reakční směsi obsahovalo 20 mmol Tris o pH 8,0, 4 mmol chlorido hořečnatého, 1,2 mmol EDTA, 25 μ mol NAD, vždy 100 μ mol dATP, dGTP, dCTP a dTTP a 50 μ Ci 32 P dCTP o 3000 Ci/mmol. Reakce se spustí přidáním 3 jednotek DNA polymerázy I, 0,5 jednotky DNA ligázy, a 0,75 jednotek ribonukleázy H s následnou inkubací 18 hodin při teplotě 16 $^{\circ}$ C a pak hodinu při teplotě 37 $^{\circ}$ C, načež se reakce zastaví přidáním EDTA do koncentrace 40 mmol a pak se extrahuje stejným objemem fenolu. Fenolová fáze se zpětně extrahuje 50 μ l TE, vodné fáze se slijí a cDNA se oddělí od nevčleněných trifosfátů chromatografií na sloupci prostředku Sepharose CL-4B, tak, jak bylo popsáno svrchu v případě prvního řetězce. V závislosti na včlenění 32 P se první řetězec cDNA kvantitativně převedl do formy s dvojitým řetězcem.

Stupeň 4 Příprava rekombinantní cDNA

Na zakončení cDNA byly navázány homopolymerní C-sledy opatrným zahřátím 400 ng cDNA v 50 μ l reakční směsi, která obsahovala 1 mmol 2-merkaptoethanolu, 1 mmol chloridu kobaltnatého a 9 jednotek terminální deoxynukleotidiltrasferázy 5 minut při teplotě 30 °C. Pak byla reakce zastavena přidáním EDTA do koncentrace 40 mmol s následným zahřátím na 10 minut na teplotu 68 °C. Pak bylo 200 ng získáno cDNA navázáno na 500 ng pAT153 se zakončeními G (Amersham) v 100 μ l 10 mmol Tris o pH 7,5, 1 mmol EDTA a 100 mmol chloridu sodného. Vazba byla ~~přxx~~ prováděna 2 hodiny při teplotě 57 °C při 5 minutách předběžné inkubace při teplotě 68 °C.

Stupeň 5 Transformace bakterií

Průdukt, získaný vazbou cDNA byl přímo užit k transformaci kmene *E. coli* MC1061. Čerstvá kolonie bakterií byla užita k naočkování 50 ml L-bujonu a byla pěstována několik hodin tak dlouho, až optická hustota při 550 nm byla 0,25. Bunky byly zchlazeny v ledu a pak byly odděleny

odstředěním 10 minut při 2000 otáčkách za minutu. Získaná usazenina byla znovu uvedena do suspenze v 10 ml chladného 0,1 M chloridu vápenatého a pak byla ponechána v ledu po dobu 10 minut. Pak byly buňky odstředěny 5 minut při 2000 otáčkách za minutu, načež byly znovu uvedeny do suspenze v 2,5 ml 0,1 M chloridu vápenatého. Pak bylo 10 μ l reakční směsi pro vazbu cDNA inkubováno s 200 μ l bakterií, na něž bylo působeno chloridem vápenatým nejprve 30 minut v ledu a pak 2 minuty při teplotě 37 °C, načež bylo přidáno 0,8 ml L-bujonu a buňky byly inkubovány ještě 30 minut při teplotě 37 °C.

Bylo provedeno celkem 20 transformačních reakcí při využití veškerého množství navázané cDNA. Každá z transformačních směsí byla nanesena na plotny o průměru 15 cm, které obsahovaly L-bujon s obsahem 1 % agaru a 10 μ g/ml tetracyklinu. Z 20 provedených transformací bylo připraveno 20 takto upravených ploten a tyto plotny byly inkubovány přes noc při teplotě 37 °C. Na každé plotně vyrostlo přibližně 1500 kolonií bakterií, což znamená celkem 30 000 ~~kni~~ klonů.

Stupeň 6 Výroba kopií

Původní kolonie, rostoucí na každé plotně byly přeneseny na nitrocelulosové filtry o průměru 137 mm tak, že suchý filtr byl přitlačen na horní stranu plotny s koloniemi a pak byl opět sejmut. Z každého originálního filtru byly pak připraveny dvě totožné kopie běžným způsobem tak, aby bylo možno přesně označit části, které si odpovídají. Každý původní filtr byl opatrně uložen koloniemi vzhůru na sterilní filtrační papír (Whatman 3 MM), nacházející se na skleněné desce. Pak byl na tento filtr uložen předem zvlhčený nitrocelulosový filtr, tento filtr byl přikryt druhým větším úsekem filtračního papíru a filtry pak byly k sobě přitlačeny druhou skleněnou deskou. Filtry byly očíslovány a byly na třech nesymetrických místech propíchnuty špendlíkem tak, aby bylo možno je v budoucnosti znovu přesně přiložit. Pak byla kopie oddělena od původního filtru a byla uložena koloniemi vzhůru na novou plotnu s L-bujonem, agarem a tetracyklinem. Okamžitě bylo pak stejným způsobem přiložen další čistý filtr, čímž byla získána další kopie. Pak byl původní filtr navrácen

na agarovou plotnu a všechny plotny byly několik hodin inkubovány při teplotě 37 °C, po této době měly kolonie bakterií průměr přibližně 1 mm. Původní filtry byly skladovány při teplotě 4 °C k přípravě kopií, sloužících k hybridizaci svrchu uvedeným způsobem.

Stupeň 7 Úprava filtrů pro hybridizaci

Každá kopie původního filtru, získaná ve stupni 6 byla uložena koloniemi směrem vzhůru na filtračním papíře (Whatman 3 MM), který byl zvlhčen 0,5 M hydroxidem sodným a 1,5 M chloridem sodným na 7 minut. Filtry pak byly neutralizovány, zvlhčeny na 2 minuty v 1 M Tris o pH 7,5 s 1,5 M chloridem sodným, načež byly znovu neutralizovány 5 až 10 minut a pak byly uloženy na filtry, zvlhčené pufrům SSC na 5 minut (0,015 M citrát sodný, 0,15 M chlorid sodný, pH 7,4), pak se filtry usuší na vzduchu, načež se zahřívají 1 až 2 hodiny ve vakuu na teplotu 80 °C.

Stupeň 8 Isolace klonů cDNA CSF

Kopie filtrů byly ve dvojím provedení uvedeny do styku s včleněnou cDNA pCSF-1 po radioaktivním označení, plasmid byl připraven způsobem podle příkladu B. S cDNA hybridizovalo 20 kolonií. 12 z těchto kolonií bylo odděleno a pěstováno přes noc v L-bujonu pro další analýzu. Materiál, který byl získán rozštěpením restriktivním enzymem Pst I z těchto klonů byl poněkud nesourodý, avšak tři z těchto klonů měly téměř plnou délku požadovaného sledu. U jednoho z těchto sledů byl proveden podrobný rozbor celého sledu. Sled, který byl kódem pro CSF v tomto klonu byl totožný s odpovídajícím sledem plasmidu, pCSF-1, což znamená, že obsahoval T v poloze 365-CSF(Ile).

P ř í k l a d D

Čištění CSF z buněčné linie Mo

40 l prostředí z pěstování buněčné linie Mo se inkubuje 30 minut při teplotě 55 °C

k inaktivaci viru HTLV-II, spojeného s touto buněčnou linií. Pak se prostředí zahustí ultrafiltrací pod tlakem při použití zařízení Pellicon Casette s membránou PTGC(1/6 m²), se schopností oddělit ~~lá~~ látku do molekulové hmotnosti 10 000. Bílkovina se pak ~~další~~ dále koncentruje vysrážením síranem amonným do nasycení na 80 %. 800 mg výsledné bílkoviny se znovu uvede do suspenze ve 100 ml 20 mmol tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochloridu (Tris-HCl) o pH 7,4 a materiál se pak dialyzuje proti témuž pufru celkem 3x vždy při použití 4 l pufru. Dialyzovaná bílkovina se pak nanese na sloupec o rozměrech 2,5 x 10 cm s obsahem DEAE (diethylaminoethyl)-ultrogelu, v rovnovážném stavu v tomtéž pufru. Sloupec se pak promývá 800 ml 20 mmol tris-HCl o pH 4 a pak 800 ml 20 mmol tris-HCl o pH 7,4 s obsahem 0,12 M chloridu sodného, čímž se počne vymývat látka s účinností CSF. Odebere se řada frakcí po 10 ml, účinné frakce se slijí. Jde celkem o tři frakce, které se zahustí na 1/6 svého objemu, tj. na 5 ml ultrafiltrací pod tlakem při použití membrány Amicon YM5, která odděluje sloučeninu do molekulové hmotnosti 5000). Koncentrovaný vzorek z DEAE-sloupce se nanesou na sloupec o rozměru 1,6 x 100 cm s obsahem

AcA44 ultrogelu (akrylamidagarosový ultrogel s frakcionací do 10 až 130-k jednotek molekulové hmotnosti) sloupec je v rovnovážném stavu ve 20 mmol kyseliny N-2-hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonové (HEPES), o pH 7,4 s 50 mmol chloridu sodného a 0,01 % polyethylenglykolu (PEG-8000). Látka s účinností CSF, která byla vymývána ze sloupce měla molekulovou hmotnost 30 k jednotek. Účinné frakce byly slity a byla k nim přidána kyselina trifluoroctová (TFA) do koncentrace 0,15 objemových procent přidáváním 10% roztoku této kyseliny, načež byla získaná směs nanesena na sloupec o rozměrech 1 x 25 cm s obsahem prostředku Vydac C₄ v reversní fázi. Sloupec byl vyvíjen lineárním gradientem 0 až 90 % acetonitrilu v 0,1 % objemových TFA rychlostí 4 ml/min, bylo získáno celkem 1000 ml eluátu. Látka s účinností CSF se vymývá při koncentraci acetonitrilu přibližně 47 % objemových. Účinné frakce se slijí a upraví se na koncentraci 0,05 % objemových kyseliny heptafluormásečné (HFBA) přidáním 0,15% HFBA a získaný materiál se pak nanesou na sloupec o rozměrech 0,46 x 25 cm s obsahem prostředku Vydac C₄ v rovnovážném stavu ve HFBA o koncentraci 0,15 % objemových. Sloupec se vyvíjí lineárním gradientem 0 až 90 % objemových acetonitrilu

v 0,15 % objemových HFBA rychlostí 1 ml/min, získá se celkem 340 ml eluátu. Látka s účinností CSF se vymývá při koncentraci acetonitrilu přibližně 53 % objemových. Účinné jsou frakce 37 až 44, každá z nich měla objem 1 ml. 0,15 ml frakce 40 bylo zahuštěno na 1/4 objemu při použití koncentračního zařízení SAVANT Speed Vac a pak bylo přidáno 40 μ l 2x SDS pufru (0,125 M Tris-HCl o pH 6,8, 4 % SDS, 20 % glycerolu a 0,004 % bromfenolové modři). Tyto vzorky byly povařeny 2 minuty a pak byly nanесeny na 13,5% SDS gel způsobem podle publikace Lamli, U. Nature 227, 680 (1970), jak je znázorněno na obr. 2. Frakce 40 měla účinnost 110 000 jednotek/ml při použití buněk kostní dřeně. To odpovídá přibližně $3,0 \times 10^7$ jednotek na jednu jednotku absorbance A_{280} . Protože typické bílkoviny mají extinkční koeficienty v rozmezí 0,8 až 1,2 jednotek A_{280} v miligramu, má čištěný CSF specifickou účinnost v rozmezí 1×10^7 až 4×10^7 jednotek/mg. Vzorek 1 μ g čištěného GM-CSF byl podroben Edmanově degradaci při použití zařízení, Applied Biosystems Gas Phase Microsequenator. Sled mezi zbytky 3 až 5 byl Ala Arg Ser.

P ř í k l a d E

Kotransformací a amplifikací sledu CSF v bunčkách CHO byl včleněn plasmid p91023(B)-CSF do buněk DUKX-B11, které neobsahují DHFR CHO, jak bylo popsáno v publikaci Chasin a Urlaub PNAS 77, 4216 (1980), a to fúzí protoplastu, popsanou v publikaci Sandri-Goldin a další, Mol. Cell. Bio. 1, 743 - 752, 1981. Růst a udržování buněk CHO bylo popsáno v publikaci Kaufman a Sharp, J. Mol. Bio. 150, 601 - 621, 1981. Při provádění fúze protoplastů byl plasmid p91023(B)-CSF-1 včleněn do kmene E. coli HB101 a bakterie byly pěstovány v 50 ml prostředí m9 s obsahem solí a 0,5 % aminokyselin kaseinu, 0,4 % glukosy, 0,012 % síranu hořečnatého, 5 µg/ml thiaminu a 10 µg/ml tetracyklinu do adsorbance 0,6 při 600 nm. Chloramfenicol byl přidán do koncentrace 250 µg/ml a kultura byla inkubována při teplotě 37 °C k pomnožení kopií plasmidu. Pak byly bunčky odstředěny při 3000 otáčkách/min po dobu 10 minut při teplotě 4 °C a pak byly uvedeny do suspenze ve 2,5 ml chlazené 20% sacharosy v 50 mmol Tris-HCl o pH 8,0. Pak byl přidán lysozym, a to 0,5 ml roztoku o koncentraci 5 mg/ml v 0,25 M

Tris-HCl o pH 8,0 a směs se pak uloží do ledu na 5 minut. Pak se přidá 1 ml 0,25 M EDTA o pH 8,0 a směs se uloží do ledu na dalších 5 minut a pak se přidá 1,0 ml 0,05 M Tris-HCl o pH 8,0 a suspenze se inkubuje 15 minut při teplotě 37 °C, po této době se bakterie přemění na protoplasty. Pak se suspenze pomalu zředí 20 ml předeřátého prostředí, které obsahuje 10 % sacharosy a 10 mmol chloridu hořečnatého, načež se směs nechá stát 15 minut při teplotě 37 °C. Pak se přidá roztok protoplastu (přibližně 10^9 /ml) k buňkám DUKX-B11 bez DHFR CHO v plotnách o šesti vyhloubeních v množství přibližně 1×10^6 buněk/vyhloubení v poměru přibližně 1 až 2×10^4 protoplastů/buňka a protoplasty se peletují spolu s buňkami odstředěním 8 minut při 2000 ot/min při použití odstředivky IEC model K. Po odstředění se supernatant odsaje a přidají se 2 ml roztoku polyethylenglykolu (50 g PEO-1450, Baker Chem. Co. v 50 ml prostředí) do každého vyhloubení svrhu uvedené plotny. Pak se buňky znovu odstředí 90 sekund při 2000 ot/min, roztok polyethylenglykolu se odstraní a plotny se opláchnou 3x vždy 4 ml prostředí/vyhloubení, Pak se buňky zpracují působením trypsinu, uvedou se do suspenze v 10 ml pro-

středís obsahem 10 % fetálního telecího sera a pak se odstředí ve zkumavce (konické) při 500 ot/min v běžné odstředivce. Peletované buňky ze tří vyhloubení se spojí a nanesou na plotnu o průměru 10 cm, ke každé plotně se přidá čerstvé prostředí, které obsahuje 100 μ g/ml kanamycinu, thymidinu, adenosinu, deoxyadenosinu, penicilinu a streptomycinu a 10 % dialyzovaného fetálního telecího séra. Kanamycin se přidává k γ zamezení růstu jakýchkoliv bakterií, které by přetrvávaly při přeměně na protoplasty.

Po dvou dnech byly buňky přeneseny v poměru 1 : 15 do prostředí α - s 10 % dialyzovaného fetálního telecího séra, penicilinu a streptomycinu, avšak bez nukleosidů. Pak bylo k buňkám přidáno totéž selektivní prostředí bez nukleosidů ještě po 4 až 5 dnech.

Kolonie se objevily po 10 až 12 dnech pěstování v selektivním prostředí. Pak byly prováděny dva pokusy na selekci působením methotraxátu (MTX) a pokus na amplifikaci. V první serii pokusů byly izolovány jednotlivě nezávisle klonované transformanty podle exprese DHFR a každý klon

byl pěstován za podmínek, při nichž dochází k amplifikaci počtu kopií cizorodé DNA, tj. při použití stoupajícího množství methotrexátu. Při druhé serii pokusů byla izolována směs nezávislých transformantů podle exprese DHFR a tato směs byla dále pěstována za podmínek, při nichž dochází k amplifikaci cizorodé DNA, tj. při stoupající koncentraci methotrexátu. Pak byly izolovány jednotlivé klony a analyzovány na expresi GM-CSF. Klony, které vykazovaly nejvyšší úroveň exprese GM-CSF byly dále pěstovány za podmínek, při nichž dochází k amplifikaci cizorodé DNA, tj. při stoupající koncentraci methotrexátu v živném prostředí.

Při jednom z pokusů bylo spojeno sedm transformantů ^aDHFR⁺ v prostředí α bez nukleosidů. Tyto buňky pak byly pěstovány při stoupající koncentraci MTX od 0,02 μ mol přes 0,1 a 0,5 až do 2,0 μ mol. Při zkoumání na účinnost GM-CSF při použití buněk KG-1 bylo možno prokázat 3000 až 12 000 jednotek/ml. Tyto buňky pak byly klonovány v 0,5 a 2,0 μ mol MTX. Klony, které byly získány v 0,5 μ mol MTX (klony O10, D2 a B6) byly postupně podrobeny selekci na růst v 2,0 μ mol MTX. Při zkouškách na účinnost GM-CSF při pokusu s buňkami KG-1 produkovaly klono-

vané buněčné linie 15 000 až 300 000 jednotek/ml, této účinnosti. K GM-CSF, produkováný buňkami při provádění způsobu podle tohoto příkladu má sled aminokyselin, uvedený pro CSF-Thr na obr. 1.

P ř í k l a d F

Exprese GM-CSF v E. coli

Exprese GM-CSF bylo dosaženo v E. coli při použití vektoru pTALC-195R, jde o materiál, který je znázorněn na obr. 6. Sled, který je kódem pro GM-CSF začíná syntetickým sledem ATG CCA CCA CCT CCT TCT CCA TCT CCA TCT ACT, který určuje počátečních jedenáct zbytků aminokyselin úplného GM-CSF. Zbytek sledu, který je kódem pro GM-CSF v pTALC-185R je totožný se sledem v pCSF-1, nukleotidy 97 - 447, načež přichází sled TAR TAR TAG. Pak ihned následuje terminační sled, sestávající ze tří částí a z navázaného sledu p-UC-18. Do genu pro CSF byl včleněn gen pro odolnost proti tetracyklinu z plasmidu pBR322 s orientací opačnou než je orientace genu pro CSF 100 bází směrem dolů od sledu pUC-18. Gen pro odolnost proti tetracyklinu

nese svůj vlastní promotor. Pak se ve směru opačném než je směr hodinových ručiček nachází gen pro β -laktamásu a pak sled z pUC-18 (CoLE1) pro počátek replikace.

Konečnou strukturou plasmidu před návratem ke sledu pro CSF je promotor PL. Tento promotor je v podstatě popsán v publikaci A. Skatzman a M. Rosenberg (v "Molecular cloning, a laboratory manual" (1982), Cold Spring Harbor Laboratory, str. 419). Exprese CSF je řízena promotorem PL po tepelné indukci ve vhodném kmenu E. coli jako hostiteli.

Kmenem, použitým pro všechny tyto konstrukce byl kmen W3110 $\text{lacI}^{\text{O}}\text{L8}$, popsaný v publikaci R. Brent a M. Ptashne PNAS 78 (1981) 4204 - 4208.

Fragment λ DNA (λ -nukleotidy 34499 až 38214) byl integrován do chromosomu W3110 $\text{lacI}^{\text{O}}\text{L8}$ v místě lacZ. Integrace byla provedena při použití integračního vektoru, složeného ze sledů pBR325, nesoucích geny pro odolnost proti chloramfenikolu a ampicilinu a také počátek pro replikaci z pBR322, jak bylo popsáno v publikaci F. Bolivar Gene 4 (1978) 121 - 136. Fragment λ DNA se včlení do genu lacZ, který je sám v plasmidu přítomen jako fragment, který zasahuje od místa BstEil v LacI k místu TthIII

směrem dolů od lacZ.]

Integrace λ DNA do p chromosomální kopie λ lacZ bylo dosaženo homologní rekombinací a byly získány lac⁺, na ampicilin citlivé a proti chloramfenikolu odolné kolonie. K další rekombinaci, která vedla k odstranění všech přídatných sledů plasmidů při ponechání integrovaného fragmentu λ DNA došlo na plotnách MacConkeyho s obsahem laktosy. Počáteční fenotyp lac⁺, amp^S, cam^R se změnil po druhé rekombinaci na fenotyp lac⁻, amp^S, cam^S. Výsledný kmen byl nazván GL400 a měl vlastnosti λ^R při teplotě 30 °C a λ^S při teplotě 42 °C. Tento fenotyp prokazuje existenci funkční chromosomální kopie ~~xxx~~ alely CI⁸⁵⁷.

Kmen GL400 byl převeden na lon⁻ transdukci PL z lysátu kmene SG20252 (lac Δ ul69, ara Δ 139 rps1 lon Δ 100::Tn10). Tn10 byl nalezen] při testech na Tet^S na selektivních prostředích, jak bylo popsáno v publikaci S. Maloy, W. Nunn, J. Bacteriol. 145 (1981) 1110 - 1112.

Výsledný hostitelský kmen byl nazván GI413 (lacI⁰L8, LacZ Δ . (λ CI, REX, N), lon Δ 100

pTALC-185R byl transformován na GI413. Kultura tohoto kmene, která vyrostla přes noc,

byla pěstována při teplotě 30 °C v 5 ml indukčního prostředí s obsahem 7 µg/ml tetracyklinu. Indukční prostředí obsahuje v 1 litru

20 g aminokyselin kaseinu

6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

3 g KH_2PO_4

0,5g NaCl

1 g NH_4Cl

1 % glycerolu

2 mg vitaminu B₁

2 mg $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,2 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

25 ml tohoto prostředí s obsahem 7 µg/ml tetracyklinu se naočkuje 125 µl svrchu uvedené kultury a kultura se dále pěstuje na vodní lázni při teplotě 30 °C za třepání tak dlouho, až živné prostředí dosáhne optické hustoty 0,5 při A₅₅₀. Pak se prostředí rychle přenese do vodní lázně o teplotě 40 °C a protřepává se další 2 hodiny k dosažení syntézy GM-CSF. Buněk se oddělí a prokazuje se obsah CSF v těchto buňkách elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu. Za těchto podmínek se GM-CSF nahromadí tak, že tvoří přibližně 5 % buněčných bílkovin.

P ř í k l a d G

Exprese GM-CSF v *Saccharomyces cerevisiae*

A. Konstrukce vektoru

Byl zkonstruován plasmid, který obsahoval gen pro enzym při biosyntéze uracilu (URA3) jako selekční gen při počátku replikace 2u. Plasmid byl odvozen od Ylp5, který byl popsán v publikaci Botstein a další, Gene 8, str. 17 - 24 (1979) při přidání fragmentu, obsahujícího počátek replikace z plasmidu kvasinek.

B. Isolace genu pro glycerinaldehydfosfát

Dehydrogenáza (GPDH)

Dva geny pro ~~GPND~~ GPDH byly izolovány z kvasnic, jak bylo popsáno v publikaci Holland a Holland, Journal of Biological Chemistry 255, str. 2596 - 2605 (1980). Vzorek oligonukleotidu, syntetizovaný z uveřejněného sledu byl užít k izolaci genu pro GPDH ze sestavy plasmidů DNA genomu kvasnis při použití standardních způsobů. Plasmid,

který obsahuje celý gen GAP491 byl již do sbírky uložen dříve pod č. ATCC č. 39777.

C. Příprava promotoru glycerinaldehydfosfátdehydroge-
názv pro expresi heterologního genu

Byl zkonstruován plasmid, v němž se udržuje přirozený odstup promotoru GPDH od začátku požadovaného heterologního strukturálního genu. Tohoto cíle bylo dosaženo tak, že bylo včleněno místo pro působení enzymu KpnI bezprostředně ke kodonu pro methionin na počátku strukturálního genu pro GPDH. Tato oblast byla pak včleněna do vektoru pro expresi YOp1 kvasnic.

D. Isolace genů pro faktor α

Gen pro faktor α (fenomon) byl rovněž izolován z kvasnic a byl popsán v publikaci Kurjan a Herskowitz Cell, sv. 30, str. 933 - 943 (1982). Vzorek oligonukleotidu, syntetizovaného z tohoto sledu byl užit k izolaci genu ze sestavy plasmidů DNA genomu ^{uk} ~~kvasnic~~ známým způsobem.

E. Příprava plasmidu pro expresi CSF

Ze svrchu uvedených součástí a z lidského genu pro CSF byl běžným způsobem zkonstruován vektor pro expresi AJ14, znázorněný na obr. 1. V tomto vektoru byl odstraněn přírodní vedoucí sled CSF a byl včleněn sled, který je kódem pro úplný CSF v bezprostřední blízkosti sledu pro faktor α . Spojení mezi promotorem GPDH, pre-pro sledem pro faktor α a sledem pro úplný CSF je znázorněno dále a bylo potvrzeno tak, že byl analyzován sled dideoxynukleotidu.

AAATAAACAAAATG.CGTTTTCTTCA AAA AGA GAG GCG GAA
GCT.GCA CCC GCC CGC TCG ...

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Vektor zahrnující gen kódující bílkovinu GM-CSF primátů, která má aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 1 za šipkou pro CSF-Thr, CSF-Ile nebo CSF-G, nebo její alelické nebo jiné funkční ekvivalenty, zachovávající si aktivitu GM-CSF v testu na lidské kostní dřeni, ve kterých je alespoň jedna aminokyselina přidána, nahrazena nebo odstraněna.

2. Vektor podle nároku 1, kde uvedený gen kóduje bílkovinu, která má aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 1 za šipkou pro CSF-Thr nebo CSF-Ile, nebo její alelické nebo jiné funkční ekvivalenty, jak jsou definovány v nároku 1.

3. Vektor podle nároku 1 nebo 2, přičemž funkční ekvivalenty GM-CSF primátů, pokud se vyčistí, mají v testu na lidské kostní dřeni aktivitu alespoň $1 \cdot 10^7$ jednotek na mg bílkoviny.

4. Vektor podle nároku 1 nebo 2, kde uvedený gen kóduje bílkovinu, která má aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 1 za šipkou pro CSF-Thr.

5. Vektor podle nároku 1 nebo 2, kde uvedený gen kóduje bílkovinu, která má aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 1 za šipkou pro CSF-Ile.

6. Vektor podle nároku 1, kde uvedený gen kóduje bílkovinu, která má aminokyselinovou sekvenci uvedenou na obr. 1 za šipkou pro CSF-G.

~~7. Vektor podle nároku 4, 5 nebo 6, kde aminokysel~~
linová sekvence bílkoviny, kterou kóduje uvedený gen,

dodatkově zahrnuje na svém N-konci signální sekvenci, která předchází šipce na obr. 1.

8. Vektor podle nároku 4, 5 nebo 6, kde aminokyselínová sekvence bílkoviny, kterou kóduje uvedený gen, dodatkově zahrnuje na svém N-konci methioninový zbytek.

9. Vektor podle nároku 1, kde uvedený gen zahrnuje sekvenci uvedenou na obr. 1 pro CSF-Thr nebo CSF-Ile, začínající za šipkou a končící na kodonu odpovídajícím aminokyselině v poloze 127.

10. Vektor podle nároku 1, kterým je plasmid p91023(B) deponovaný pod číslem ATCC 39754.

11. Hostitelská buňka, která je transformována vektorem podle libovolného z nároků 1 až 10.

12. Hostitelská buňka podle nároku 11, transformovaná vektorem podle libovolného z nároků 2, 3, 4, 5, 9 nebo 10.

13. Hostitelská buňka podle nároku 11 nebo 12, která je prokaryotická.

14. Hostitelská buňka podle nároku 13, kterou je *Escherichia coli*.

15. Hostitelská buňka podle nároku 11 nebo 12, která je eukaryotická.

16. Hostitelská buňka podle nároku 15, kterou je kvasinková buňka.

17. Hostitelská buňka podle nároku 15, kterou je savčí buňka.

18. Hostitelská buňka podle nároku 17, kterou je buňka vaječníku čínského křečka.

19. Způsob výroby bílkoviny GM-CSF primátů, v y - z n a č u j í c í s e t í m , že se kultivuje buňka podle libovolného z nároků 11 až 18 a izoluje se bílkovina GM-CSF.

20. Způsob výroby bílkoviny GM-CSF primátů, podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , že se kultivuje buňka podle libovolného z nároků 12 až 18 a izoluje se bílkovina GM-CSF.

21. cDNA, která odpovídá genu uvedenému v libovolném z nároků 1 až 10.

22. cDNA podle nároku 21, která odpovídá genu uvedenému v libovolném z nároků 2, 3, 4, 5, 9 a 10.

23. cDNA plasmidu p91023(B), který je deponován pod číslem ATCC 39754.

20

Obr. 1

PRC V A I E
A O S J E V Y
U R A D

7U 5059-85

X

GCT GGA66 ATG TGG CTG CAG AGC CTG CTG CTC GTT6 GGC ACT GTG GGC TGC
MET Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val Ala Cys

80

Ser CSF-G

Arg CSF-G

AGC ATC TCT GCA CCC GCC CCG TCG CCC AGC CCC AGC AC6 CAG CCC TGG GAG CAT
CSF-thr Ser Ile Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr Gln Pro Trp Glu His

140

GTC AAT GCC ATC CAG GAG GCC CCG CGT CTC CTG AAC CTG AGT AGA GAC ACT GCT
Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu Ser Arg Asp Thr Ala

200

Ile CSF-G

Val CSF-G

GCT GAG ATG AAT GAA ACA GTA GAA GTC ATC TCA GAA ATG TTT GAC CTC CAG GAG
Ala Glu MET Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu MET Phe Asp Leu Gln Glu

260

CCG ACC TGC CTA CAG ACC CCG CTG GAG CTG TAC AAG CAG GGC CTG CAG GGC AGC
Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln Gly Leu Arg Gly Ser

320

CTC ACC AAG CTC AAG GGC CCC TTG ACC ATG ATG GCC ABC CAC TAC AAG CAG CAC
Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr MET MET Ala Ser His Tyr Lys Gln His

Ile CSF-Ile

TGC CCT CCA ACC CCG GAA ACT TCC TGT GCA ACC CAG ACT ATC ACC TTT GAA ACT
Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln Thr Ile Thr Phe Glu Ser

100

380

Thr CSF-G

TTC AAA GAG AAC CTG AAG GAC TTT CTG CTT GTC ATC CCC TTT GAC TGC TGG GAG
Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro Phe Asp Cys Trp Glu

450

460

470

480

490

500

Gly CSF-G

CCA GTC CAG GAG TGA GACCGGCCAG ATGAGGCTGG CCAAGCCGGG GAGCTGCTCT CTCATGAAAC
Pro Val Gln Glu

127

510

520

530

540

550

560

570

AAGAGCTGGA AACTCAGGAT GGTGATCTTG CAGGACCAAA GGGGTGGGCC ACATCCATGG TGGGAGTGGC
580 590 600 610 620 630 640

CGGGACCTGC CCTGGGCCAC ACTGACCTTG ATACAGGCAT GGCAGAGAAA TGGGAATATT TTATCTGAC
650 660 670 680 690 700 710

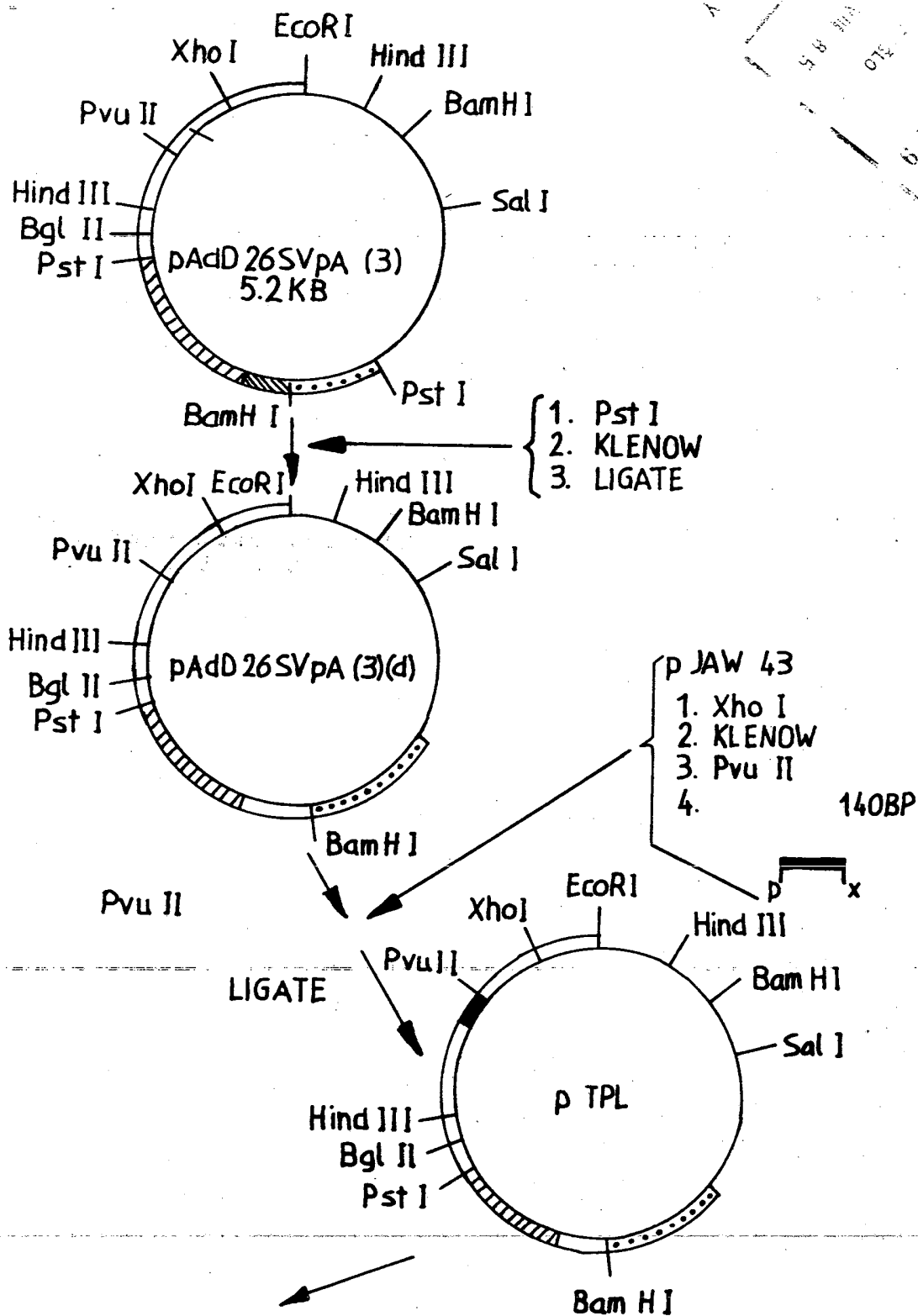
AGAAATCACT AATATTATTA TATTATATT TTAAATAT TTATTATTI ATTATTATTA GTTCATATTC
720 730 740 750 760 770 780

CATATTATT CAGATGTTI TACCGTAATA ATTATTATTA AAAATATGCT TCTAAAGAAA AAAAGAAAGAA

Tm

50985 7SK

Obr. 2



Handwritten signature

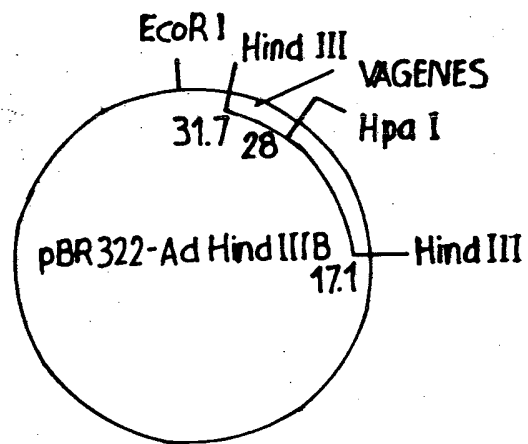
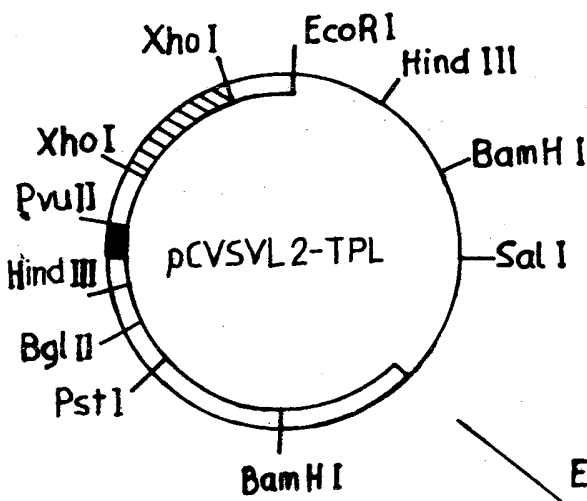
1019-85 75K

Obr.3

XhoI COMPLETE
OF pTPL

SV40 DNA
1. Aua II
2. Xho I

LIGATE

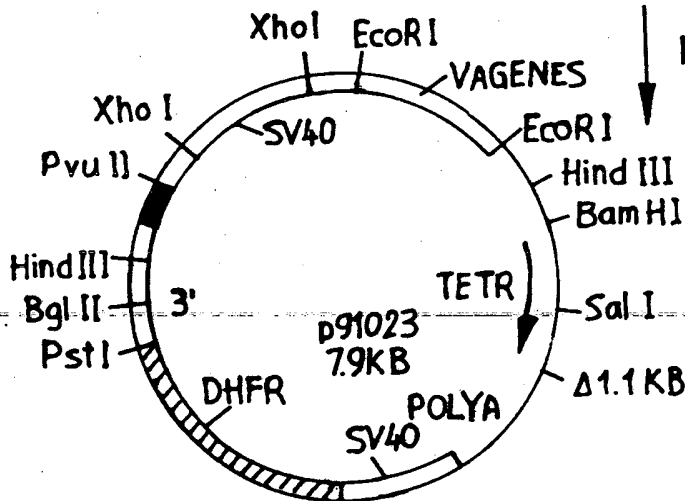


EcoRI

1. HpaI
2. EcoRI
3. EcoRI

1.4 KB

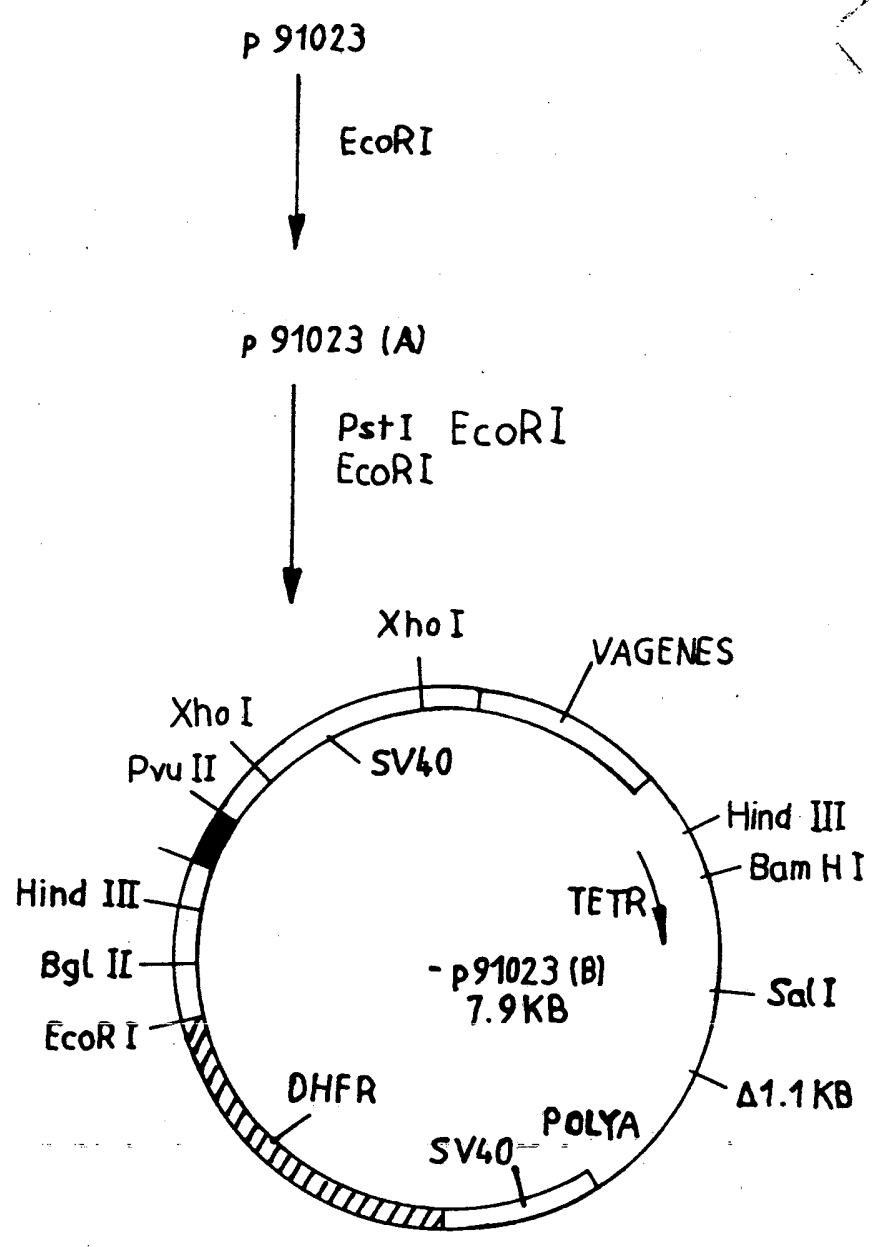
LIGATE



Handwritten signature

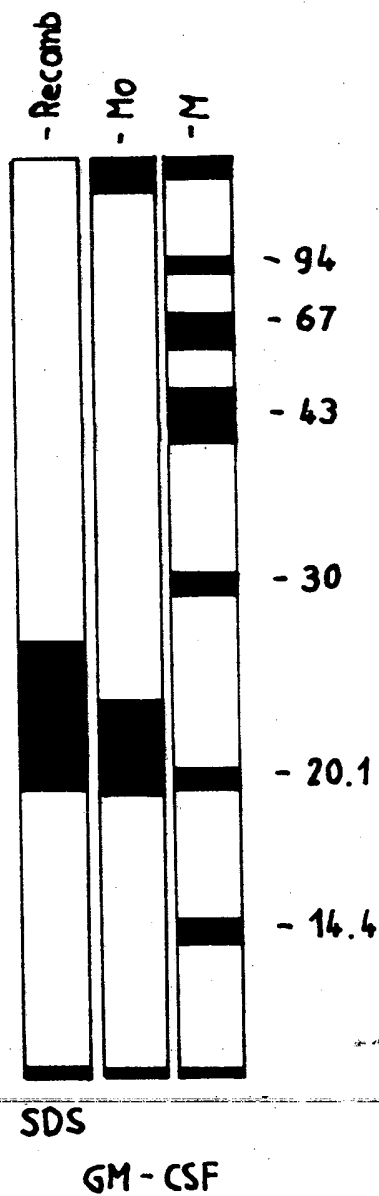
JD19-85 TSK

Obr. 4



12/20

DK

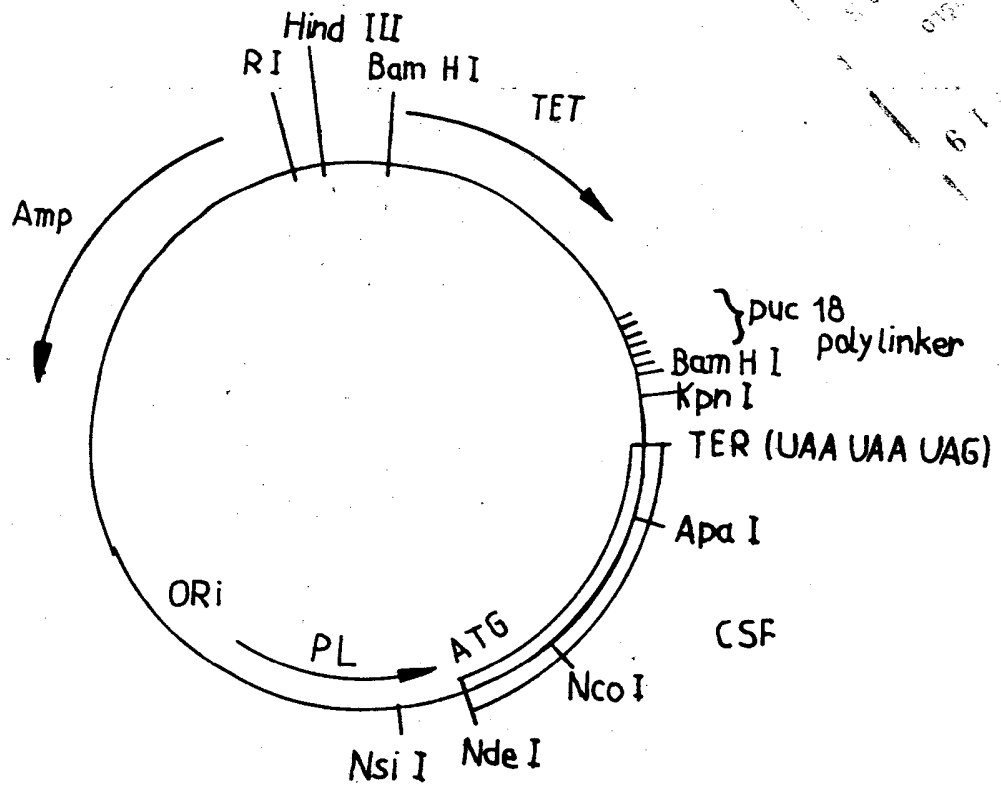
[illegible]

1017-85

TSK

Obi.6

p TALC-185 R

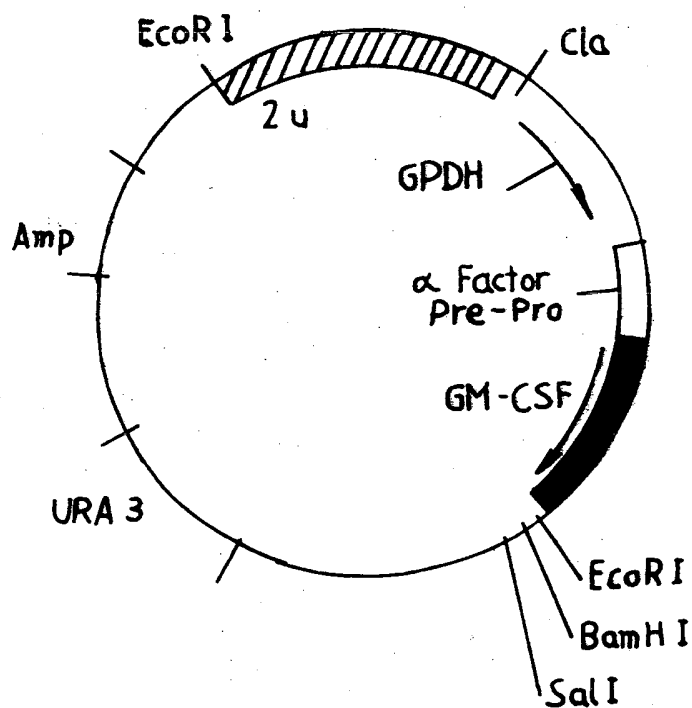


Handwritten signature or initials.

SD19-85
TSC

Obr. 7

CSF Plasmid AJ-14



PROV. ALBANY
ALBANY, N.Y.
JAN 11 1986
JAN 11 1986
JAN 11 1986

[Handwritten signature]