

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG (11) 60250 B2
5(51) C 07 K 3/18



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 70958

(22) Заявено на 04.07.85

Приоритетни данни

(31) 628059 (32) 05.07.84 (33) US

(31) 627959 (32) 05.07.84 (33) US

(31) 628060 (32) 05.07.84 (33) US

(31) 677156 (32) 03.12.84 (33) US

(31) 677257 (32) 03.12.84 (33) US

(31) 677454 (32) 03.12.84 (33) US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № на

(45) Отпечатано на 28.02.94

(46) Публикувано в бюлетин № 2
на 15.02.94

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег.

(73) Патентоприитежател(и):

Genentech Inc., San Francisco, CA
(US)

(72) Изобретател(и):

Bharat E. Aggarwal, San Mateo, CA
David Vannorman Goeddel,
Hillsborough, CA

Sang He Lee, El Granada, CA

Glenn Evan Nedwin, Guilford, CT (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Валентина Великова Нешева, 1618
София, ул. "Княз Борис I" 99, ет. 2,
Р.О.В. 53

(86) № и дата на РСТ заявка:

(87) № и дата на РСТ публикация:

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА ТУМОР НЕКРОЗИСФАКТОР

(57) Методът намира приложение в медицината за получаване на продукт, чист от хомоложни клетки и плазмени протеини. С него се изолира, пречиства, стабилизира и лиофилизира тумор некрозисфактор (ТНФ) от клетъчни култури посредством ензимен синтез на гена на човешки ТНФ, конструират се вектори за експресия на гена в три вида клетки гостоприемници - Е.коли, дрожди и клетки на бозайници, пречиства се рекомбинантният ТНФ и се приготвят на терапевтични препарати на негова основа.

27 претенции, 11 фигури

BG 60250 B2

(54) МЕТОД ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА ТУМОР НЕКРОЗИСФАКТОР

Изобретението се отнася до метод за получаване на тумор некрозисфактор.

Предшестващо състояние на техниката.

Известно е, че имунни клетки, такива като В клетки, Т клетки, естествени клетки с цитотоксично действие и макрофагите, изработват вещества, които проявяват цитотоксична активност спрямо туморните клетки, но са безвредни за нормалните клетки. Тези вещества са известни като лимфотоксин, тумор некрозисфактор, II К клетъчен цитотоксичен фактор, хеморагичен некрозисфактор, макрофагов цитотоксин или макрофагов цитотоксичен фактор, но идентичността на протеините, свързани с тези имена, е неясна. Основните затруднения идват от това, че използваният биологичен анализ за откриване на протеините наистина не изключва някои от тях; по всяка вероятност, протеините се намират в природата под формата на агрегати или хидролитични продукти и получените досега количества са толкова малки, че високата степен на чистота, необходима за пълното охарактеризиране на протеините, не е достигната.

Такива цитотоксични вещества са открити в серума на незасегнати животни или в културалните супернатанти на лимфни клетки или на клетъчни линии, след като животните или клетките са третирани с вещество, известно с това, че стимулира пролиферацията на имунни клетки (един "индуцер"). След като серумът или супернатанта са извлечени, се анализират за цитотоксична активност спрямо определена туморна клетъчна линия. Стандартният шаблон е L-929, миша туморна клетъчна линия. Тази клетъчна линия, както и други от този тип, използвани за биоанализ, са неспецифични в своя литичен отговор, защото множество очевидно отделни лимфни клетъчни продукти са способни да причинят лизис. Подобни неспецифични отговори се наблюдават и при анализите *in vitro* за некроза на тумори. Цитолитичният анализ, който следи за лизиса на клетъчни линии *in vitro* или за некроза на тумори *in vivo*, не е адекватен на различията сред множеството цитотоксични лимфни продукти.

Цитотоксичните фактори са класирани на основата на лимфните клетки, от които се произвеждат. Например лимфотоксинът е име, обикновено прилагано към цитотоксичните секреторни продукти на В- или Т-лимфоцитите или на клетъчните линии, които произхождат от тях, докато туморният некрозисфактор често се използва за означаване на продуктите на макрофагите или на произхождащите от тях клетъчни линии. Тази система на класификация не е развита до степен, при която да има сигурност, че само един единствен протеин се отнася към едно наименование или че протеини, означавани с различни наименования, са в действителност различни.

Направени са опити за пречистване и охарактеризиране на цитотоксичните фактори, секретирани от всеки клетъчен тип. От факта, че направените съобщения се различават относно отличителните качества на даден цитотоксичен фактор или са в пълно противоречие по отношение на дадено отличително свойство, може да се направи изводът, че или охарактеризирането е погрешно, или множество отделни цитотоксични фактори се секретират от всеки клетъчен тип. Например цитотоксичните продукти, произхождащи от макрофагите, моноцитите или моноцитните клетъчни линии, докато понякога общо се отнасят като туморен некрозисфактор, има съобщения за техни качества, които изглеждат несъвместими с теорията на единичен цитотоксичен продукт. /1, 2, 3 и 4/.

От друга страна се твърди /5/, че лимфотоксинът от морски свинчета и цитотоксичният фактор от макрофаги на морски свинчета са имуно-химически подобни, ако не и идентични. До подобни изводи са стигнали и други автори /6/.

Опитите за охарактеризиране на имунни цитотоксични фактори също са съсредоточени върху използването като изходен материал на серума или перитонеалната течност на животни, които са били подложени на действието на имуногенни антигени. Тези източници съдържат цялото изобилие на стресовата имунна система в противовес на продукта или продуктите на единичен клетъчен тип или линия. Като примери за публикации от този тип могат да послужат следните

източници: /7/, /8/, /9/, /10/, /11/, /12/, /13/, /14/, /15/, /16/, /17/, /18/, /19/.

Други източници, които могат да бъдат използвани за справка, са /20, 21, 22, 23 и 24/. Описан е /25/ цитотоксичен полипептид, който е пречистен и в значителна степен освободен от онечиствания, от човешка лимфобластоидна клетъчна култура. Този полипептид е означен като лимфотоксин, въпреки че неговото сродство с други, описани под наименованието лимфотоксин полипептиди, е предполагаемо. Не е известно, дали това е единственият цитотоксичен полипептид, изработен от имунни клетки, както се предполага /5/, или е един от потенциалното семейство на цитотоксичните фактори.

Описаният полипептид /25/ има два аминокиселинни завършка (края), по-голям вариант, завършващ с LeuPuo Gly Val Gly L euThr ProSer Ala Gln Ttr Ala Arg Gln His Pro L ysMet His LeuAla Ser Thr..., и по-малък вариант с отрязани аминокиселинни завършка His Ser Thr Leu Lys Pro Ala Ala...

Съгласно известните литературни източници интерфероните, които проявяват известна инхибираща активност спрямо туморите, и слабо охарактеризиран протеин, с Ala Ala аминокиселинни завършка, /26/ са лимфотоксин цитотоксични фактори. Туморният некрозисфактор съгласно изобретението не е интерферон, не е лимфотоксин и няма Ala Ala аминокиселинни завършек.

Методът за получаване на тумор некрозисфактор, се състои в това, че: а/ получава се нуклеинова киселина, кодираща тумор некрозисфактор; б/ конструира се вектор за експресия на тумор некрозисфактор чрез свързване на нуклеиновата киселина към вектор, съдържащ транскрипционална промоторна последователност и последователности за контролиране на терминацията на транскрипцията и транслацията на нуклеиновата киселина, кодираща тумор некрозисфактор; в/ трансформиране на клетки на гостоприемник с вектор от етап б/; г/ култивиране на клетките на гостоприемника от етап в/; д/ оставя се тумор некрозисфактор да се натрупа в културата; е/ извличане на тумор некрозисфактор от културата.

Един цитотоксичен фактор е пречистен до степен на хомогенност, охарактеризиран е и е експресиран в рекомбинантна култура. Този фактор е обозначен като тумор некрозисфактор /TNF/ за удобство и е дефиниран по-долу. Той е получен в по същество хомогенна форма от клетъчна култура.

Човешки тумор некрозисфактор, синтезиран в рекомбинантна култура, е охарактеризиран посредством наличието на нечовешки клетъчни компоненти, включително протеини, в количества и с характер, които са физиологически приемливи за прилагане на пациенти заедно с туморния некрозисфактор. Тези компоненти обикновено са от дрожден, прокариотен или нечовешки по-висш еукариотен произход и присъстват като онечиствания в безвредни количества от порядъка на по-малко от 1 % тегл. По-нататък рекомбинантната клетъчна култура е способна да произвежда тумор некрозисфактор, абсолютно свободен от хомоложни протеини. Хомоложни протеини са онези протеини, които обикновено са свързани с туморния некрозисфактор, такъв, какъвто е открит в природата, например в клетки, клетъчни ексудати или телесни флуиди. Например хомоложен протеин за човешки туморен некрозисфактор е човешкият серумен албумин. Хетероложни протеини са обратното, т.е. те не са естествено свързани или не се откриват в комбинация с тумор некрозисфактор.

Създадена е ДНК, която кодира тумор некрозисфактор и която, когато се експресира в рекомбинантна или трансформирана култура, води до получаването на обилно количество от тумор некрозисфактор. Тази ДНК е нова, защото с ДНК, получена посредством обратна транскрипция на мРНК от индуцирана моноцитна клетъчна линия, не съдържа нитрони и е свободна от всякакви области, които кодират други протеини на организма, от който произхожда мРНК.

Хромозомната ДНК, кодираща тумор некрозисфактор, е получена посредством изпробване на геномната ДНК със сДНК. Хромозомната ДНК е свободна от области, които кодират други протеини, но може да съдържа интрони.

Изоланата тумор некрозисфактор ДНК може лесно да се модифицира посредством заместване, заличаване или вмъкване на

нуклеотиди, при което в резултат се получават нови ДНК последователности, кодиращи тумор некрозисфактор или неговите производни. Тези модифицирани последователности са използвани за продуциране на мутантен тумор некрозисфактор и за директна експресия на зрял тумор некрозисфактор. Модифицираните последователности също са полезни за повишаване ефективността на експресирането на тумор некрозисфактор в избрани приемник-вектор системи, например посредством модификация за приспособяване към предпочитанието на кодона на клетката приемник.

Тези нови ДНК последователности или фрагменти от тях са белязани и са използвани в хибридизационен анализ за генетичен материал, кодиращ тумор некрозисфактор.

При методите за синтез на тумор некрозисфактор ДНК, която кодира за тумор некрозисфактор, е свързана във възпроизводим вектор. Векторът се използва за трансформация на клетките-приемници, които се култивират, и тумор некрозисфакторът се извлича от културата. Този метод се използва за изграждане на тумор некрозисфактора, който има характеристиките на моноцитния тумор некрозисфактор или за изграждане на нови производни на тумор некрозисфактора в зависимост от конструкцията на вектора и от клетките-приемници, избрани за трансформация. Видовете тумор некрозисфактор, които могат да се синтезират съгласно изобретението, включват зрял (валил аминокзавършващ) тумор некрозисфактор претумор некрозисфактор (preTNF, дефиниран тук) и производни на тумор некрозисфактор, включващи: а/ свързани протеини, при които TNF или някакъв негов фрагмент, включително зрял тумор некрозисфактор, е свързан към други протеини или полипептиди посредством пептидна връзка при аминок- и/или карбоксикрайна аминокиселина на TNF или на неговия фрагмент; б/ TNF фрагменти, включително зрял тумор некрозисфактор, или фрагменти от preTNF, в който всяка препротеинова аминокиселина е аминокзавършващата аминокиселина на фрагмента; в/ мутанти на тумор некрозисфактор или негови фрагменти, включващи зрял тумор некрозисфактор, при което един или повече аминокиселинни

остатъци са заместени, вмъкнати или заличени и/или г/ метионил или модифициран метионил (като формил метионил или други видове блокиран метионил), аминокзавършека, допълнителни производни на споменатите протеини, фрагменти или мутанти.

Обикновено, ако клетката на бозайник се трансформира с а/ вектор, съдържащ целия структурен ген за тумор некрозисфактор (включително 5'-начален кодон), или б/ ген за зрял тумор некрозисфактор, оперативно свързан към еукариотен секретирален лидер, който може също да включва пред последователността на тумор некрозисфактор, секретирания лидер и клетъчна култура, от културата се извлича зрял тумор некрозисфактор.

Ако ДНК, кодираща TNF, е свързана оперативно във вектор към секретирален лидер, който е обработен правилно посредством клетката-приемник, която трябва да бъде трансформирана (обикновено организъмът, от който е получена последователността на лидера), приемникът се трансформира с вектора и се култивира, тогава се синтезира тумор некрозисфактор без аминокзавършека метионил или блокиран метионил. В частност *E. coli*, трансформирани с вектори, в които ДНК кодира зрял тумор некрозисфактор, свързана 5'- към ДНК, която кодира STII сигналния полипептид на ентеротоксина, ще преработят както трябва висок процент от хибридният препротеин в зрял тумор некрозисфактор. Могат да бъдат избрани секретирални лидери и клетки-приемници, което също води до правилен транспорт на зрял тумор некрозисфактор в клетъчната периплазма.

В обхвата на изобретението влизат също така и производни на тумор некрозисфактор, различни от тези с промени в аминокиселините последователности или в гликозилирането. Такива производни се характеризират с ковалентно или агрегатно свързване с химическите части. Общо производните спадат към три класа: соли, ковалентни модификации на странични вериги или крайни остатъци и абсорбционни комплекси.

Ако ДНК, кодираща зрял тумор некрозисфактор, е оперативно свързана във вектор, който е използван за трансформиране на клетка-приемник, и клетката е култивирана

в клетъчната цитоплазма, се открива зрял тумор некрозисфактор. Необходимо е да се създаде такава секретиреща система, че да се получи зрял тумор некрозисфактор. Обикновено, директната експресия води до получаването на метионилиран протеин, стабилен и разтворим в рекомбинантната клетъчна култура, т.е. той нито е протеолитично разцепен от вътреклетъчните протеази, нито се отлага като рефрактилни тела. Създадени са нови ферментации, които включват по-нисши еукариотни или прокариотни клетки, имащи немитонилиран зрял тумор некрозисфактор, който е събран (концентриран) в цитоплазмата на такива клетки.

Докато тумор некрозисфактор може да бъде получен посредством култивиране на животински клетъчни линии, например моноцитни клетъчни линии, индуцирани чрез растеж в присъствието на 4- β - форол-12-миристен-13-ацетат (РМА), или клетъчни линии, като хибридоми или EBV трансформирани клетки /27/, за предпочитане е тумор некрозисфактор да се синтезира в рекомбинантна клетъчна култура, както е описано по-долу.

След като тумор некрозисфактор е получен посредством ферментация, той обикновено се пречиства посредством извличане на супернатантния културален флуид или лизирана клетъчна култура, отстраняват се твърдите вещества, тумор некрозисфакторът се адсорбира от супернатантната смес, съдържаща тумор некрозисфактор и други протеини, върху хидрофобно вещество, тумор некрозисфакторът се елуира от веществото и се адсорбира върху анионообменна смола съдържаща третични аминоксигрупи тумор некрозисфакторът се елуира от смолата и се адсорбира върху анионообменна смола, за предпочитане съдържаща кватернерни аминоксигрупи, която по същество има еднакъв размер на частичките, и тумор некрозисфакторът се елуира от смолата. По желание, съставите на тумор некрозисфактора се концентрират и пречистват посредством хроматофокусиране във всеки момент (етап) на методиката за пречистване, например посредством изоелектрично фокусиране или преминаване през пресяващ гел като "Sephadex G-25".

За фармацевтична употреба пречистеният тумор некрозисфактор от рекомбинантна или индуцирана клетъчна култура, се комбинира с физиологично безвредни стабилизатори и ексципиенти и се приготвят дозажни форми посредством лиофилизация в дозажни флакони или се съхранява във вид на стабилизирани водни препарати. Алтернативно, тумор некрозисфакторът се влага в полимерна матрица, предназначена за имплантиране в тумори или на места, от които туморът е изрязан по хирургичен път, при което тумор некрозис факторът се освобождава с времето на определеното място с висок градиент на концентрация.

Получените съгласно изобретението състави са свободни от онечистващи цитотоксични фактори - лимфотоксин, интерферони или други цитотоксични протеини, които се свързват с него. Обаче при терапевтично приложение тумор некрозисфакторът, за предпочитане се комбинира с предварително определени количества от лимфотоксин и/или интерферон. Установено е, че състави, съдържащи тумор некрозисфактор и един интерферон, такъв като γ - интерферон, са особено полезни, тъй като е открито, че тези състави проявяват синергитична токсична активност.

Съставите, съдържащи тумор некрозисфактор, са прилагани на животни, по-специално на пациенти със злокачествени тумори, в терапевтично ефективни дози. Подходящата дозировка е дадена по-нататък в описанието на терапевтичното действие.

Описание на приложените фигури:

фигура 1 представлява крива на елуиране на тумор некрозис фактора през стъкло с контролирани пори (отвори);

фигура 2 - крива на елуиране на тумор некрозис фактора от диетиламиноетил-целулоза;

фигура 3 - крива на елуиране на тумор некрозисфактора от бърза течна хроматография на протеини;

фигура 4 - кривата на елуиране на тумор некрозисфактора при хроматофокусиране;

фигура 5 - молекулно тегло на тумор некрозис фактор, получено посредством SOS PAGE гелна електрофореза.

фигура 6 - молекулно тегло на тумор некрозисфактора, получено при високоефективна течна хроматография;

фигура 7 - крива на елуиране на тумор некрозисфактор от високо ефективна течна хроматография с C4 колона;

фигура 8 - разделяне с помощта на високоефективна течна хроматография на фрагменти на тумор некрозисфактора, получени с трипсин;

фигури 9 - цитотоксичен ефект на смеси от γ - интерферон и тумор некрозисфактор;

фигура 10 - нуклеотид и аминокиселинна последователност на човешки тумор некрозисфактор, включително пълния секреторен лидер на тумор некрозисфактора.

фигура 11 - строеж на експресиращия вектор на тумор некрозисфактора.

фигура 12 - стабилен на топлина E.coli STII ентероксин ген.

Техническа същност на изобретението.

За целите на изобретението туморнекрозис факторът се определя като полипептид, различен от лимфотоксина, имащ избирателна цитотоксична активност, с област, показваща функционална аминокиселинна хомология с аминокиселинния ред на зрелия тумор некрозисфактор, както е изобразен на фиг. 10, с негов фрагмент или с производно на такъв полипептид или фрагмент.

Избирателната цитотоксична активност се определя като избирателно унищожаване (разграждане) или инхибиране на растежа на туморните клетки при сравнение с нормалните клетки, поставени при същите условия. Избирателната цитотоксична активност се открива посредством действието на полипептида върху туморни клетки *in vivo* или *in vitro*, при сравнение с нормални клетки или тъкани. Лизисът на клетката е диагностичната индикация *in vitro*, докато некрозата на тумора се определя при опити *in vivo*. Цитотоксичната активност може да се проявява и като цитотоксична или антипролиферативна активност. Известни са подходящи опитни системи за тази цел. Например, приемлив за целта е опита за лизис на клетката за определяне на специфичната активност на тумор некрозисфактора, описан в литература /28/.

Специфичната активност на тумор некрозисфактора се изчислява при условията

на лизис на шаблонна клетка. Една единица активност на тумор некрозисфактора се определя като количеството, необходимо за 50 % лизис на шаблонните клетки, посети по описания в пример 1 начин. Обаче това не означава, че се изключват другите методи за определяне на специфична активност, например методите, базиращи се на определяне степента на растеж на шаблонни клетки.

Предтумор некрозисфакторът е разновидност на тумор некрозисфактора, включен в посочената по-горе дефиниция на тумор некрозисфактора. Той се охарактеризира посредством присъствието в молекулата на сигнален (водещ) полипептид, който служи за следтранслационно насочване на протеина към място вътре или извън клетката. Сигналният полипептид, който няма сам по себе си тумор некрозисна активност, е протеолитично отцепен от остатъчен протеин, който има тумор некрозисна активност като част от секреторния процес, при който протеинът се транспортира в периплазмата на културалната среда на клетката-приемник. Сигналният пептид може да бъде с микробиален произход или от бозайник (включително природен, 76 остатък) предпоследователността, но за предпочитане е сигналният пептид да бъде хомоложен спрямо клетката приемник.

Природният тумор некрозисфактор от нормални биологични източници има изчислено молекулно тегло 17,000 при гелна електрофореза с натриев додецилполиакриламид (SDS-PAGE), изоелектричен пункт при около 5,3 и податливост на хидролиза с трипсин на множество места. Природният тумор некрозисфактор, който е пречистен с помощта на високоефективна течна хроматография-обратна фаза, се хидролизира с трипсин на поне девет фрагмента при условията, описани по-долу.

Точният брой на фрагментите, до които тумор некрозисфакторът се хидролизира с помощта на трипсин, зависи от такива фактори, като активността на трипсина, концентрацията на тумор некрозисфактора, параметрите на инкубиране, включващи йонната сила, рН, температурата и времето на инкубиране.

Тумор некрозисфакторът не е гликопротеин, тъй като не се задържа върху лектинафинитетни колони и анализът на изведения аминокиселинен ред не съдържа подобни места на гликозилиране. Материалът, продуциран в рекомбинантна *E. coli* култура, която няма склонност към гликозилиране, мигрира едновременно в природния тумор некрозисфактор при SDS-PAGE

Степента на хомология на аминокиселинната последователност, която носи полипептид, попадащ в обхвата на определението за тумор некрозисфактора, дадено по-горе, варира в зависимост от това, дали хомологията между кандидат протеинът и тумор некрозис фактора попада във или извън областите на тумор некрозисфактора, отговорни за цитотоксичната активност; области, които са критични за цитотоксичната активност биха показали висока степен на хомология, така че да попаднат в определението, докато последователности, невключени в поддържащата тумор некрозисфактор конформация или в действащия свързващ рецептор, могат да показват сравнително ниска хомология. Критичните области могат да показват цитотоксична активност и да останат хомоложни, както е определено, ако остатъци, съдържащи функционално подобни странични аминокиселинни вериги, са заместени. Функционалното подобие се отнася до основните характеристики на страничните вериги - базична, неутрална или кисела, или до присъствието или отсъствието на пространствени структури. Обаче тумор некрозисфакторът изключва лимфотоксина.

Полипептидът, дефиниран като тумор некрозисфактор, ще съдържа области, по същество хомоложни с протеина от фиг. 10 или с негови фрагменти, върху непрекъснат блок от 10 до 100 аминокиселинни остатъци, в частност блоковете, обградени от остатъците 35-66 и 110-133.

Основен критерий при установяването на идентичността на полипептид като тумор некрозисфактор е способността на антисерума за значително неутрализиране на цитолитичната активност на зрелия тумор некрозисфактор (фиг. 10) и също за значителна неутрализация на цитолитичната активност на полипептида. Трябва да се знае, че не е

необходимо имунобиологичната тъждественост и цитотоксичната идентичност да съществуват съвместно. Неутрализиращо антитяло на тумор некрозисфактора съгласно фиг. 10 може да не свърже кандидат протеин, защото неутрализиращото антитяло може да не е насочено към специфичното място за свързване върху тумор некрозисфактора, критично за неговата цитотоксична активност. Вместо това антитялото може да свърже безвредна област и да прояви своето неутрализиращо действие посредством пространствено пречене. Затова кандидат протеин, мутиран в тази безвредна област, може повече да не свързва неутрализиращото антитяло, но въпреки това ще бъде тумор некрозисфактор със значителна хомология и биологична активност.

От значение е, че характеристиките, такива като молекулно тегло, изоелектричен пункт и други, на природния или див тип зрял човешки туморнекрозисфактор (фиг. 10), получен от периферен лимфоцит или култури на създадени клетъчни линии, са описателни само за природните видове тумор некрозис фактор. Тумор некрозисфакторът, както е описан в посочената по-горе дефиниция, включва и други видове, които не ще проявяват всички характеристики на природния тумор некрозисфактор. Тумор некрозисфакторът, както е дефиниран, включва природния тумор некрозисфактор и други свързани с него цитотоксични полипептиди. Например производните на тумор некрозисфактора, като мутанти от вмъкване, мутанти от заличаване или присъединени протеини, описани по-горе, ще имат молекулно тегло, извън молекулното тегло, установено за природния човешки тумор некрозисфактор (свързаните протеини със зрелия тумор некрозисфактор или пред тумор некрозисфактора, както и мутантите от вмъкване ще имат по-високо молекулно тегло от природния зрял тумор некрозисфактор, докато мутантите от заличаване на природния зрял тумор некрозисфактор ще имат по-малко молекулно тегло). Тумор некрозис факторът може да бъде обработен по такъв начин, че да се намали или елиминира податливостта му към хидролиза с трипсин или други протеази. Следтранслационното обработване на човешкия предтумор некрозисфактор в клетъчни линии, произхождащи от бозайници,

които не са примати, може да доведе до микрохетерогенетичност в крайната аминокиселинна област, така че валинът да не бъде повече крайната аминокиселина.

Аминокиселинната последователност за човешки тумор некрозисфактор от сДНК е описана на фиг. 10. Зрелият или природен тумор некрозисфактор е представен с аминокиселинните остатъци от 1 до 157. Тази последователност включва 76 остатъчна сигнална последователност, за която се предполага, че се отстранява по време на нормалната обработка на транслираното копие за получаване на зрелия протеин. Местата за хидролиза с трипсин са означени със стрелки.

Трябва да се отбележи, че изразът "способен" да прояви цитотоксична активност или туморен некрозис *in vivo* означава, че тумор некрозисфакторът включва полипептиди, които могат да бъдат превърнати, например посредством хидролиза с ензими, от неактивно състояние, аналогично на цимоген в полипептиден фрагмент, който проявява желаната биологична активност. По-специално неактивни прекурсори (предшественици) ще присъединят протеини, в които зрелият тумор некрозисфактор е свързан посредством пептидна връзка при неговите карбоксилни краища към човешки протеин или негов фрагмент. Последователността на тази пептидна връзка е подбрана така, че да бъде податлива на протеолитична хидролиза за освобождаване на тумор некрозисфактор *in vivo* или *in vitro*. Така създаденият тумор некрозисфактор ще проявява изискваната от дефиницията цитотоксична активност.

Докато тумор некрозисфакторът обикновено означава човешки тумор некрозисфактор, тумор некрозисфактор от други източници, такива като миши, свински, конски, говежди, се включва в определението за тумор некрозисфактор дотолкова, доколкото в друго отношение удовлетворява изискванията за хомоложност и цитотоксична активност. Тумор некрозисфакторът не е специфичен вид, т.е. човешкият тумор некрозисфактор е активен и при миши тумори. Затова тумор некрозисфактор от един вид може да се използва за лечение на друг вид.

Тумор некрозисфакторът включва и мултимерни форми. Тумор некрозисфакторът спонтанно се агрегира в мултимери, обикновено

димери или по-висши мултимери. Мултимерите са цитотоксични и съответно са подходящи за употреба при терапия *in vivo*. Желателно е тумор некрозисфакторът да се експресира и извлича като хомогенен по същество мултимер или мономер, но при терапевтичната му употреба той може да се използва като смес от различни мултимери.

Производните на тумор некрозисфактора са включени в обхвата на тумор некрозисфактора. Производните включват мутанти на аминокиселинната последователност, гликозидни варианти и ковалентно свързани или агрегати с други химически съединения или части от тях. Ковалентно свързаните производни се получават посредством свързване на функциите към групи, които са намерени в страничните аминокиселини вериги на тумор некрозисфактора или при N- или G- краищата с помощта на средства, известни от областта на техниката. Тези производни могат например да включват: алифатни естери или амиди на карбоксикраищата или на остатъци, съдържащи карбоксилни странични вериги, например asp10; O-ацилни производни на остатъци, съдържащи хидроксилни групи, такива като ser52, ser3, ser4 или ser5; N-ацилни производни на крайна аминокиселина или на съдържащи аминогрупи остатъци, например лизин или аспаргин, и производни на cys101 и cys69. Ацилните групи се подбират от групите с алкилна част (включително C3 до C10 алкил с нормална верига), като се получават алканоилни производни и от карбоциклени или хетероциклени съединения, при което се получават ароилни производни. Реактивоспособните групи за предпочитане са бифункционални съединения, използвани при омрежване на протеини до получаване на неразтворими матрици чрез реактивоспособни странични групи. Предпочитаните места за получаване на производни са цистеновия и хистидинов остатък.

Ковалентно свързаните или присъединителни (агрегати) производни са полезни като реактивни при имуноанализа или при осъществяване на методиките за пречистване по афинитетен път. Например, тумор некрозисфакторът се превръща в неразтворимо производно посредством ковалентно свързване към активирана с

бромциан Sepharose (със или без омреждане с глутаралдехид) за използване при анализ или за пречистване на антитумор некрозисфактор антитела или клетъчни повърхностни рецептори. Тумор некрозисфакторът също се бележи с групи, които могат да бъдат откривани, например белязан с радиоактивен йон посредством хлорамин Т-процедура, ковалентно свързан към хелати на редки земни метали или сложни съединения (конюгати) с други флуоресциращи съединения или части от тях за използване в диагностичните опити, по-специално за диагностиране на количеството тумор некрозисфактор в биологични проби при паралелния тип имуноанализ. Такива производни могат да попаднат извън определението за тумор некрозисфактор, защото не е необходимо да проявяват цитотоксична активност, а само кръстосана реактивност с антитумор некрозисфактора.

Мутантните производни на тумор некрозисфактора включват предварително определени, т.е. на специфично място, мутации на тумор некрозисфактора или негови фрагменти. Задачата на мутагенезата е да се създаде ДНК, която кодира тумор некрозисфактор, както е определен по-горе, т.е. тумор некрозисфактор, който проявява цитотоксична активност спрямо туморни клетки *in vitro* или причинява некроза на тумори *in vivo* и който запазва остатъчна хомология с последователността от фиг. 10, но който същевременно проявява подобрени качества и активност. Мутантен тумор некрозисфактор е определен като полипептид в друго отношение и попада в определението за хомология на тумор некрозисфактор, дадено по-горе, на който има аминокиселинна последователност, различна от тази на тумор некрозисфактора, поради заличаване, заместване или вмъкване. Например лизиновият или аргининовият остатък на тумор некрозисфактора (аргинин 2,6,82,44 и 131 и лизин 98,90 и 65) могат да бъдат мутирани в хистидинов или друг аминокиселинен остатък, който прави протеина протеолитично стабилен. По подобен начин цистеин 101 може да бъде заместен с други остатъци и химически омрежен по такъв начин, че да подобри устойчивостта на окисление. Не е необходимо тези мутанти да отговарят на изискванията за

активност на тумор некрозисфактора, дори биологично неактивните мутанти могат да бъдат полезни при въвеждане на белязан атом или при имобилизация като реактиви за имуноанализ. Обаче в този случай мутантите трябва да запазят поне едно епитопично място, което има кръстосана реактивност с антитяло на тумор некрозисфактор.

Областите от молекулата на тумор некрозисфактора при остатъци 35 до 66 и 110 до 133 включително показват значителна хомология (50 %) с лимфотоксина. Хидрофобните карбоксикрайща (за тумор некрозисфактора остатъци 150 до 157) на двете молекули също се запазват в значителна степен. Тъй като двата протеина показват цитотоксична активност или некроза на тумори, предполага се, че тези области са от значение при разделяне активността на лимфотоксина и тумор некрозисфактора. Ето защо, остатъците в тези области са предпочитани за мутагенеза, която има за цел директно повлияване на активността на тумор некрозисфактора върху дадена клетка. Относително незапазената област при остатъци 67-109 на тумор некрозисфактора може да функционира за правилно разполагане на двете заобикалящи относително хомогенни области при същественото приспособяване за цитотоксична активност. Това разполагане, което може да бъде постигнато с Cys 69-Cys 101 дисулфидна връзка в тумор некрозисфактора, може аналогично да бъде осъществено посредством съответстващата област на лимфотоксина и могат да се отчитат различията в специфичността и активността на двете молекули. Във връзка с това, тъй като се предполага, че тези остатъци представляват активния център на тумор некрозисфактора, те могат да се синтезират по химичен път или посредством заличаваща мутагенеза като срязани полипептиди с малка дължина, които имат активността на тумор некрозисфактора.

Докато мястото на мутация е определено предварително, не е необходимо самата мутагенеза да бъде предварително определена. Например, за да се оптимизира осъществяването на мутанти в положение 131, може да се проведе безпорядъчна (оставена на случая) мутагенеза при кодона за аргинин 131 и да се експресират мутанти на тумор некрозисфактор, подбрани за оптимална

комбинация на цитотоксична активност и устойчивост на протеаза. Методиките за осъществяване на заместителни мутации при предварително определени места в ДНК, която има известна последователност, са добре познати, например M13 капсулна (праймър) мутагенеза.

Мутагенезата на тумор некрозисфактора се осъществява чрез вмъкване на аминокиселини, обикновено от порядъка на 1 до 10 аминокиселинни остатъка, или чрез заличаване на 1 до 30 остатъка. Могат да се комбинират заместване, вмъкване или заличаване на субкомбинация, за да се достигне до крайната констуркция. Вмъкването включва аминокиселини - или карбоксизавършващо присъединяване, например хидрофобно присъединяване, прибавено към карбоксилния край. За предпочитане се провежда само заместителна мутагенеза. Очевидно мутациите в кодиращата ДНК не трябва да засягат последователността извън правилната посока на четене, за предпочитане не трябва да създават допълнителни области, които могат да продуцират вторични mRNA структури.

Не всички мутации в ДНК, която кодира тумор некрозисфактор, се експресират в крайния секретирания продукт. Например основният клас заместителни мутации на ДНК са онези, в които различен секреторен лидер или сигнал е заместен със секреторен лидер за човешки тумор некрозисфактор посредством заместване в последователността на лидера или посредством замествания, при които повечето или всички природни лидери се заменят с лидер, който е по-вероятно да бъде приет от избрания приемник. Например при конструирането на прокариотен експресионен вектор човешкият секреторен лидер се заличава в полза на лидери за бактериалната фосфатаза или топлоустойчив ентеротоксин 11, а за дрожди, лидерът се замества в полза на лидерите за дрождена инвертаза, α - фактор или киселинна фосфатаза. Обаче човешкият секреторен лидер може да бъде приет от приемници, различни от човешки клетъчни линии, най-вече от клетъчна култура от по-висши еукариотни клетки. Когато секреторният лидер е "приет" от приемника, присъединеният протеин, състоящ се от тумор некрозисфактора и лидера, обикновено се разцепва при пептидната връзка между лидера и тумор некрозисфактора в случаите, когато

това води до секреция на тумор некрозисфактор. Дори когато мутантната предтумор некрозисфактор ДНК е използвана за трансформиране на приемника и мутантният предтумор некрозисфактор се синтезира като междинен продукт, полученият в резултат тумор некрозисфактор обикновено е природен зрял тумор некрозисфактор.

Друг основен клас ДНК мутанти, които не се експресират като производни на тумор некрозисфактора, са нуклеотидните субституции, с които се повишава експресията, избягват се аминокиселинните пръстени в транскрибираната mRNA /29/ или се осигуряват кодони, които по-лесно се транскрибират (копират) от избрания приемник, например известните E.coli, предпочитани кодони за E. coli експресия.

Хомогенен по същество тумор некрозисфактор означава тумор некрозисфактор, който в значителна степен е освободен от други протеини, естествени за източника, от който се изолира тумор некрозисфактора. Това означава, че хомогенният тумор некрозисфактор е освободен в значителна степен от протеини на кръвната плазма като албумин, фибриноген, серумни протеази, α -глобулини, цитотоксични полипептиди, които не са тумор некрозисфактор, такива като лимфотоксин или интерферони или други протеини на клетката или организма, които служат като синтетичен източник за тумор некрозисфактора, включително цялата клетка или раздробените части на клетката. Хомогенният тумор некрозисфактор може да включва вещества като стабилизатори и ексципиенти, описани по-долу, предварително определени количества от протеини от клетката или организма, които служат като синтетичен източник, протеини от клетки или организми, които не са източник на тумор некрозисфактор, синтетични полипептиди, такива като поли-L-лизин. Рекомбинантният тумор некрозисфактор, който се експресира в алогенен приемник, например бактериален приемник, разбира се, се експресира напълно свободен от протеините на източника.

Тумор некрозисфакторът за предпочитане се синтезира в култури на рекомбинантни организми. Не са желателни нито периферни кръвни лимфоцити (PBLs),

ните клетъчни линии. На практика е трудно да се получат PBLs от един клас, които да са свободни от онечиствания от клетките на други класове, например да се получат макрофаги, свободни от В- или Т-клетки. Такива онечиствания правят процедурата по пречистване на продуктите от тези клетки много трудна поради наличието на други потенциални цитотоксични фактори и протеини, които се освобождават от онечистващите клетки. Нещо повече, тумор некрозисфакторът, получен от нерекомбинантна култура, е скъп и се състои само от природен тумор некрозисфактор, поради което на такива култури липсва гъвкавостта на рекомбинантна култура за подобряване качествата на тумор некрозисфактора.

ДНК, която кодира тумор некрозисфактора, се получава посредством химически синтез, посредством подбиране на обратни копия (транскрипти) на mRNK от PBL или култури от клетъчни линии, или посредством подбиране геномни депа от каквато и да е клетка. Култури от подходящи клетъчни линии включват моноцитни клетъчни линии, такива като промиелоцитни клетъчни линии, обозначени като "HL-60" (една от тях е на разположение от ATCC като CCL 240) или хистоцитната клетъчна линия от лимфома U 937 (ATCC CRL 1593). Тези и други клетъчни линии са индуцирани да експресират и секретират тумор некрозисфактор посредством излагане на клетките на химически или физически агенти, известни като туморогенни или митогенни агенти. Тумор некрозисфактор може да бъде индуциран ефективно в някои моноцитни клетъчни линии само с PMA; С други думи, обичайните агенти - липополизахариди, стафилококови ентеротоксин В или тимозин- α -1, не са така ефективни, както PMA при индуцирането на тумор некрозисфактора в тези клетъчни линии. Тъй като е необходим различен брой скрининг (подбор), за да се открие клетъчна линия, експресираща тумор некрозисфактор (съдържаща желаната pRNK), по-ефективно е просто да се синтезира генът. Синтезът е предпочитан, защото може да въведе единствени реструкционни места, с което се улеснява използването на гена във вектори, съдържащи реструкционни места, с други

думи, налични в природната последователност, и могат да бъдат съществени етапи, които да повишат ефективността на транслацията, както е описано по-долу.

ДНК е белязана чрез ковалентно свързано вещество, което може да бъде открито като флуоресцираща група, радиоактивен атом или хемилуминесцентна група посредством известни методи. След това тази ДНК се използва в обичайния хибридационен анализ, който се прилага за идентифициране на тумор некрозисфактор вектори и трансформанти, както е описано в посочените примери, или за диагностициране *in vitro*, такова като откриване на mRNK на тумор некрозисфактора в кръвни клетки. mRNK за тумор некрозисфактора е относително рядка дори в индуцирани HL-60 клетки, което може би се дължи на нестабилността на носителя в резултат на неизвестни причини. Нещо повече, периодът от време за поява на mRNK за тумор некрозисфактора е значителен. mRNK за тумор некрозисфактора се появява в клетки само за кратък период - около 4 часа, след инкубирането. В това отношение появата му се отличава от тази на лимфотоксина, който се появява около 12 часа след индуцирането, вследствие на което сДНК може лесно да се наблюдава. Обаче след като е открито наличието му и е налице напълно допълнена ДНК, обикновено се подбира сДНК енциклопедията на индуцирани HL-60 или PBLs за сДНК на тумор некрозисфактор при използване на проби, притежаващи последователности на такава ДНК. Двете HL-60 фагови лайбърри, които са подбрани в примерите, съдържат относително траен брой позитивни плаки, т.е. хибридационният анализ ще идентифицира фаги, съдържащи желаната сДНК.

Синтезиращите тумор некрозисфактор клетки на HL-60 клетъчна линия първоначално се култивират по обичайния начин до достигане на плътност около $8-12 \times 10^5$ клетки/мл. Клетките се отстраняват от културата, промиват се, прехвърлят се в свободна от серум среда и се култивират в среда, съдържаща PMA. След това култивирането продължава, докато се достигне желаната концентрация на тумор некрозисфактора в културалната среда, обикновено около 400 тумор некрозисфактора единици/мл. След това супернатантата се

избистря посредством центрофугиране или с помощта на други средства парчетата клетки се разделят от разтворимите компоненти. Центрофугирането трябва да се осъществява с ниска скорост, така че да се отстранят само суспендираните частички. След това супернатантата се пречиства, както е описано по-долу.

За предпочитане тумор некрозис-факторът се синтезира в клетки приемници, трансформирани с вектори, съдържащи ДНК, която кодира тумор некрозисфактор. Вектор е възпроизводима ДНК конструкция. Вектори се използват, за да усилят ДНК, която кодира тумор некрозисфактор, и/или да експресират ДНК, която кодира тумор некрозисфактор. Експресиращ вектор е възпроизводима ДНК конструкция, в която сДНК последователността, кодираща тумор некрозисфактор, е свързана към подходящи контролни последователности, способни да осъществяват експресия на тумор некрозисфактор в подходящ приемник. Такива контролни последователности включват промотор за препис/транскрипция/, по желание контролна операторна последователност за контрол на преписа, последователност, която кодира подходящи мРНК свързващи рибозома места, и последователности, които контролират края на преписа (транскрипцията) или транслацията (преместването).

Вектори включват плазмиди, вируси (включително фаги), фрагменти на ДНК, които могат да се интегрират, например да се интегрират в генома на приемника посредством рекомбинация. След като е трансформиран подходящ приемник, векторът се възпроизвежда и функционира независимо от генома на приемника, а в някои случаи може да се интегрира в самия геном.

Понятието "вектор" е родово спрямо "плазмид", но плазмидите са най-често използваната форма на вектор. Обаче всички други форми на вектори, които имат еквивалентна функция и които са или ще станат известни в тази област на техниката, са подходящи за използване съгласно изобретението. Подходящите вектори включват репликон и контролни последователности, които произхождат от видове, съвместими с експресиращия приемник, който е избран. Трансформираните клетки на приемника или

клетки, които са трансформирани или трансфектирани с вектори за тумор некрозисфактор, са конструирани при използване на рекомбинантна ДНК технология. Трансформираните клетки на приемника обикновено експресират тумор некрозисфактор. Експресиращият тумор некрозисфактор се отлага вътреклетъчно или се секретира в периплазменото пространство или в супернатантата на културата в зависимост от избрания приемник.

ДНК областите са действащо (използваемо) свързани, когато функционалните им групи са свързани една с друга. Например ДНК за предпоследователност или секретирал лидер е действащо присъединена към ДНК за полипептид, ако тя се експресира като протеин, който участва в секретирането на полипептида; промотор е присъединен действащо към кодираща последователност, ако контролира копирането (преписа) на последователността; рибозом свързваща страна е действащо свързана към кодираща последователност, ако е разположена така, че да позволява транслацията. Действащо (използваемо) присъединен означава близък (граничен) и в случаите на секретирал лидери, близък и при четящата фаза.

Подходящи клетки приемници са прокариотите, дрождени или по-висши еукариотни клетки. Прокариотите включват грамотрицателни и грамположителни организми, например *E.coli* или *Bacilli*.

По-висшите еукариотни клетки включват създадени клетъчни линии от бозайници, както е описано по-долу. Предпочитана клетка приемник е фаг от устойчив *E. coli* W3110 (ATCC 27,325), вид описан в примерите, въпреки че други прокариоти, такива като *E. coli* B, *E. coli*, XI776 /ATCC 31, 537/, *E.coli*; 294 /ATCC 31,446/, псевдомона видове или *Serratia Marcesans*, също са подходящи.

За експресия на тумор некрозисфактор се предпочитат системите прокариотен приемник-вектор. Тъй като молекулата на тумор некрозисфактора съдържа два цистеинови остатъка, затова предполагащ скромно потенциално изискване за следтранслационна обработка до формиране на потенциална дисулфидна връзка, *E.coli* например експресира биологично активен

тумор некротизисфактор. Микробиялният вектор съдържа източник на възпроизвеждане, възприет от бъдещия приемник, промотор, който действа в приемника, и ген за фенотипна селекция, например ген, кодиращ протеини, придаващи антибиотична устойчивост или удовлетворяващи оксотропно изискване. Подобни конструкции се приготвят за други приемници. *E. coli* типично се трансформира при използване на pBR322 плазмид, произхождащ от *E. coli* видове /29a/. pBR322 съдържа гени за устойчивост спрямо ампицилин и тетрациклин и така осигурява лесни начини за разпознаване на трансформирани клетки.

Векторите трябва да съдържат промотор, който се възприема от организма приемник. Общо това е промотор, хомоложен на избрания приемник. Промоторите, най-често използвани в рекомбинантна ДНК конструкция, включват β -лактамаза /пеницилаза/ и лактоза промотиращи системи /30, 31, 32 и 33/ и промотора, описан в /34/.

Макар, че изброените микробиялни промотори са най-често използваните, могат да се използват и други. Подробности, отнасящи се до техните нуклеотидни последователности, са публикувани, и дават възможност на специалистите в тази област да ги присъединява към ДНК, кодираща тумор некротизисфактор в плазмидни вектори /35/ и ДНК, кодираща тумор некротизисфактор. Предпочитаният вектор е pBR322, производно, съдържащо промотора на *E. coli*; алкална фосфатаза *trp* Shine-Dalgarno последователността. Промоторът и Shine-Dalgarno последователността са действащо присъединени към ДНК, кодираща тумор некротизисфактор, т.е. те са разположени така, че да промотират транскрипцията (копирането) на мРНК на тумор некротизисфактора от ДНК.

Еукариотните микроби, такива като дрождени култури, се трансформират с кодиращи тумор некротизисфактор, вектори. *Saccharomyces cerevisiae* или обикновената хлебна мая най-често се използват сред по-висшите еукариотни микроорганизми приемници, въпреки че други видове са достъпни също. Векторите на дрождите съдържат източник на възпроизвеждане (репликация) от 2 микрона дрожден плазмид или автономно възпроизвеждаща

последователност (ARS), промотор, тумор некротизисфактор, последователности за полиаденилиране и препис (транскрипция, копиране) и ген за селекция. Подходящ плазмид за експресия на тумор некротизисфактора в дрожди е YRp7, /36/, /37/ и /38/. Този плазмид съдържа *trp1* ген, който осигурява маркет за селекция за мутантен вид дрожди, които нямат способността да нарастват в триптофан, например ATCC № 44076 или PER-4-1/39/. Наличието на *trp1* връзка в генома на дрождената клетка приемник осигурява ефективна среда за откриване трансформация посредством растеж при отсъствието на триптофан.

Подходящи промотиращи последователности в дрождените вектори включват промоторите за металотионин, 3-фосфоглицераткиназа /40/ или други гликолитични ензими /41 и 42/, такива като енолаза, глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа, хексокиназа, пируват декарбоксилаза, фосфофруктокиназа, глюкоз-6-фосфат изомеразата, 3-фосфоглицерат мутаза, пируваткиназа, триосфосфатизомеразата, фосфоглюкоизомеразата, и глюकोкиназа. Подходящи вектори и промотори за използване при експресия от дрожди са описани и в /43/.

Други промотори, които имат допълнителното предимство на транскрипция (копиране, контролирана посредством условията на растеж, са областите на промоторите за алкохол дехидрогеназа 2, изоцитохром C, кисела фосфатаза, разграждащи ензими, свързани с метаболизма на азота, и споменатите металотионин и глицералдехид-3-фосфат дехидрогеназа, както и ензимите за усвояване на глюкоза и галактоза. При конструирането на подходящи експресионни плаزمиди завършващите последователности, свързани с тези гени, също са присъединени в експресионния вектор 3' - на тумор некротизисфактора кодиращите последователности за осигуряване на полиаденилация на мРНК и завършване.

Клетъчните култури, произхождащи от многоклетъчни организми, могат също да бъдат използвани като приемници, но не се предпочитат поради отличните резултати, получени с тумор некротизисфактор експресиращите микроби. Всяка по-висша еукариотна

клетъчна култура е работоспособна, независимо дали е от гръбначни или безгръбначни култури. Обаче интересът е по-голям при вертебралните (гръбначни) клетки и размножаването на гръбначните клетки в култура (тъканна култура) в последно време е станала обичайна (рутинна) методика /44/. Примери за полезни клетъчни линии приемници са VERO и Hela клетки, Chinese Hamster ovary (CHO) клетъчни линии и W138, BHK, COS-7 и MDCK клетъчни линии. Експресионните вектори за такива линии обикновено включват (ако е необходимо) източник на възпроизвеждане, промотор, разположен над гена, който трябва да се експресира, наред с рибозом свързващо място, РНК място (ако се използва нитронсъдържаща геномна ДНК), място за полиаденилиране и транскрипционен завършващ ред.

Транскрипционните и транслационните контролни последователности в експресиращите вектори, които се използват при трансформиране на гръбначни клетки, често са достъпни от вирусни източници. Например често използваните промотори произхождат от полиома Adenovirus 2 и най-предпочитания Simian virus 40 (SV40). Предишният и последният промотор са особено полезни, защото и двата се получават лесно от вируса като фрагмент, който също съдържа SV40 вирусен източник на репликация (възпроизвеждане) /45/. По-малки и по-големи SV40 фрагменти също могат да се използват и осигуряват 250 bp последователност, простираща се от HindIII място до Bgl I, разположени във вирусния източник на възпроизвеждане. Възможно е и често е желателно да се използва човешки геномен промотор, контролни и/или сигнални последователности, естествено свързани с тумор некрозисфактора, при условие, че такива контролни последователности са съвместими със системите на клетката приемник.

Източник на репликация (възпроизвеждане) може да бъде осигурен посредством конструиране на вектор, който да включва екзогенен източник, произхождащ от SV40 или от друг вирусен източник (например Polyoma, Adenovirus, VSV или BPV), или може да бъде осигурен чрез хромозомния механизъм на репликация на клетката приемник. Ако векторът е интегриран в хромозома на клетката приемник, това обикновено е достатъчно.

При подбиране на предпочитан приемник клетка от бозайници за трансфекция посредством вектори, които включват ДНК последователности, кодиращи едновременно за тумор некрозисфактор и дихидрофолатредуктаза (DHFR), е подходящо да се подбере приемник, съответстващ на типа на DHFR протеина, който се използва. Ако се използва див тип DHFR протеин, за предпочитане е да се подбере клетка приемник, на която липсва DHFR, и по този начин да се позволи използването на DHFR кодиращата последователност като маркер за успешна трансфекция в селективна среда, на която липсва хипоксантин, глицин и тимидин. Подходяща клетка приемник е клетъчната линия от яйчник на Chinese hamster (CHO), на която липсва DHFR активност, приготвена и размножена по известен начин /46/.

От друга страна, ако се използва ДНК, кодираща DHFR протеин с нисък афинитет на свързване към метотрексат (MTX) като контролираща последователност, не е необходимо да се използват устойчиви на OHFR клетки. Тъй като мутантният OHFR е устойчив на MTX, MTX съдържаща среда може да бъде използвана като средство за подбор, осигуряващ чувствителност на клетките приемник спрямо MTX. Повечето еукариотни клетки, които са способни да абсорбират MTX, изглежда са чувствителни спрямо MTX. Една такава полезна клетъчна линия е CHO линията, CHO-K1 (ATCC № CCL61).

Първоначално тумор некрозисфакторът се извлича от култури. Трансформирани несекретиращи клетки се лизират чрез обработка със звук или по друг метод и парчетата се отделят посредством центрофугиране, докато супернатантата от секретиращи клетки (като индуцирани клетъчни линии) се отдели от клетките чрез центрофугиране. Могат да се използват един или повече от следните етапи или да се заменят изцяло с други методи.

За пречистване на тумор некрозисфактор до сепен, достатъчна за редуване, се използва следният метод, при който не е необходимо това пречистване да се съпътства с пречистването, необходимо за приложението на тумор некрозисфактора като терапевтичен продукт.

В първоначален етап на пречистване тумор некрозисфакторът се адсорбира върху хидрофобно вещество от лизираната култура или супернатантна културална среда. Хидрофобното вещество за предпочитане е негелообразна хидрофобна повърхност, такава като силикат или полиолефин, като също е подходяща и алкил Sepharosa. Предпочитаното изпълнение е с порьозно стъкло с контролирани пори. Около 1 обем порьозно стъкло с контролирани пори се смесва с 50 обема супернатанта и се оставя адсорбцията да протече при около 4°C без рязбъркване в продължение на 30 мин до 2 часа, за предпочитане за около 1 час, при слабо алкални условия. След това адсорбентът се промива с подходящ буфер за отстраняване на задържаните онечистващи протеини.

Адсорбираният тумор некрозисфактор се елуира от хидрофобното вещество посредством

промяна на разтворителните качества на околната среда. Елуирането може да се осъществи посредством промяна на разтворителните качества на околната среда.

5 Елуирането може да се осъществи посредством прекарването през буфериран разтвор при pH 7-8,5, за предпочитане 8, съдържащ 1 М сол и ефективно количество воден разтвор на смесим с вода органичен разтворител, такъв като полиол, например етиленгликол или глицерин, обикновено етиленгликол от 10 до 30% об., за предпочитане около 20 % об. Разбира се, оптималните условия зависят от полиола, който се използва. Съдържащият се в елуираните фракции тумор некрозис фактор се открива посредством анализ *in vitro*, както е описано по-долу, или посредством друг подходящ анализ. Пречистването и добивът от този етап на култура от моноцитна клетъчна линия, както и следващите етапи, са отразени в табл. 1.

Таблица 1

Пречистване на човешки тумор некрозисфактор от HL-60 клетъчна културална среда

Пречистване Етап	Крайни обеми, (ml)	Общо проте- ин, (mg)	Цитולי- тична активност, единици/ mg	Относителна активност единици спец	Пречистване	Извли- чане, %
Изходен материал	58,000	1,964	14.2x10 ⁶	0,007x10 ⁶	-	-
Хроматография през порьозно стъкло(контр.)	1,080	88,9	11,1x10 ⁶	0,12x10 ⁶	17	78,5
Хроматография- DEAE целулоза	285	9,05	8,9x10 ⁶	0,98x10 ⁶	140	62,7
Бърза протеин- течна хроматография Моно Q	75	0,44	6,9x10 ⁶	15.68x10 ⁶	2,240	48,6
Препаративна SDS PAG електро- фореза или C4-обратна фаза-HPLC	6	0,028	2,71x10 ^{6*}	96,79x10 ^{6*}	13,387*	19.1*

*Коригирани поради частична деструкция на активността на тумор некрозисфактора, причинена от SDS или от TFA и пропанол.

По-нататъшно пречистване се постига посредством адсорбция на тумор некрозисфактора върху терциерна или кватернерна, съдържаща аминогрупи, йонообменна смола. Предпочитаните за тази цел смоли са хидрофилни свързващи вещества - омрежен пилистирол, декстран или целулоза, заместена с алкилтерциерни или кватернерни аминогрупи. На пазара са достъпни търговски продукти от този тип като DEAE целулоза, QAE Sephadex или с търговското наименование Mono Q (във всеки случай, където етил е алкиловият заместител във всеки от тези продукти). Най-добри резултати се постигат с бърза протеинтечна хроматографска система, известна от литературата /47/, при използване на макропорьозни, по същество еднакви по големина частици /48/. Тази система дава възможност да се осъществи пречистването на тумор некрозисфактор с висока степен.

Пречистване, по същество до хомогенност, се постига само при по-нататъшно разделяне върху SDS PAG електрофореза или с C4- обратна фаза, течна хроматография, високо налягане /HPLC/, както е описано в примерите по-долу. Този продукт обаче не е желателен за терапевтична употреба, тъй като губи значителна част от активността си при контакт с SDS или органичните разтворители при високоефективната течна хроматография. Концентрацията на протеин се определя посредством метода на M. Bradford /49/. По време на крайните етапи на пречистване съдържанието на протеин се оценява посредством състава на аминокиселините и аминокиселинната последователност.

Тумор некрозисфакторът се приготвя за приложение посредством смесване на тумор некрозисфактор, имащ желаната степен на чистота, с физиологично приемливи носители, например носители, които са нетоксични спрямо реципиента в използваните дози и концентрации. Обикновено това се осъществява при комбиниране на тумор некрозисфактора с буфери и антиокислителни, като аскорбинова киселина, полипептиди с ниско молекулно тегло (по-малко от около 10 остатъка), протеини, аминокиселини, въглехидрати, включително глюкоза или декстрини, хелатиращи средства, като ЕДТА (етилендиамин тетраоцетна киселина), и други стабилизатори и ексципиенти. Носителят трябва да бъде

формулиран да стабилизира тумор некрозисфактора като димер и/или за предпочитане като тример. Това се осъществява, като се избягват соли или детергенти в концентрации, които дисоциират тумор некрозисфактора в мономери. Алтернативно, условията, които агрегират тумор некрозисфактора в по-големи мултимери, също трябва да се избягват. Най-вече нейногенните повърхностно активни средства като Tween 20 проявяват достатъчна агрегация по време на пречистването, както и при лиофилизацията или при съхранението във воден разтвор. Тумор некрозисфакторът, който ще се използва за терапевтични цели трябва да бъде стерилен, което се постига лесно посредством филтриране през стерилна филтрираща мембрана. Обикновено тумор некрозисфакторът се съхранява в лиофилизирана форма.

По желание, тумор некрозисфакторът се комбинира с други неопластични средства, такива като химиотерапевтични антибиотици (актиномицин-D, адриамицин, аклациномицин) или със средства за повишаване или стимулиране на имунния отговор, например имуноглобулини, такива като γ -глобулин, включително имуноглобулини, които имат афинитет спрямо клетъчните повърхностни антигени на неоплазмата. Тъй като интерфероните действат синергитично в комбинация с тумор некрозисфактора при анализа за лизис на клетката, желателно е α -, β - или γ -интерферон да се комбинират с тумор некрозисфактор в крайните състави или да се приготвят крайни състави, съдържащи тумор некрозисфактор и лимфотоксин. Типична формулировка съдържа тумор некрозисфактор и γ -интерферон в съотношение относно активността от 0,1:1 до 200:1, най-вече 10 до 1, и могат да съдържат и лимфотоксин, включен в пропорцията на тумор некрозисфактора. Тези пропорции, разбира се, са обект на промени в зависимост от терапевтичните нужди.

Съставите с тумор некрозисфактор се прилагат на животни, които имат тумори. Приложението е в съответствие с известните за тази цел начини, например интеравенозно, интраперитонеално, интрамускулно, чрез интралезионална инфузия, инжекции на стерилни разтвори с тумор некрозисфактора

или системи за бавно освобождаване, както е посочено по-долу. Тумор некрозисфакторът се прилага интралезионално, например посредством директно инжектиране в твърди тумори. В случаите на разсеяни тумори, такива като левкимия, се предпочита интравенозното приложение или прилагането в лимфната система. Тумори на абдоминалните органи, такива като тумор на яйчниците, за предпочитане се третират посредством интраперитонеална инфузия при използване на метални приспособления за перитонеална диализа или перитонеално съвместими разтвори. Обикновено тумор некрозисфакторът се прилага непрекъснато посредством инфузия, въпреки че са приемливи и инжекции.

Желателно е тумор некрозисфакторът да се прилага в бавно освобождаващи лекарствени изделия, които могат да се имплантират. Примери на подходящи системи за протеини, които имат молекулното тегло на димерите или тримерите на тумор некрозисфактора, включват съполимерите на L-глутаминовата киселина и γ -етил-L-глутамат /50/, поли2-хидроксиетил-метакрилат /51, 52/, или етиленвинилацетат. Това изделие се имплантира на местата, от които е изрязан по хирургически път туморът. Алтернативно, тумор некрозисфакторът е капсулиран в полупропускливи микрокапсули или липоломи за инжектиране в тумора. Този начин на прилагане е особено полезен за тумори, които не могат да се отстраняват по хирургичен път, например мозъчни тумори.

Количеството на тумор некрозисфактора, което се прилага, зависи от начина на приложение, от тумора и от състоянието на пациента. Интралезионалните инжекции изискват по-малко количество тумор некрозисфактор на база телесното тегло от интравенозните инфузии, докато някои тумори, например твърдите тумори, са по-устойчиви на тумор некрозисфактора от други тумори, например левкимия. За лекаря е необходимо да определи дозата и начина на приложение, нужни за получаване на оптимална цитотоксична активност спрямо шаблонен тумор, което може да се определи посредством биопсия на тумора, или чрез диагностичен анализ за предполагаеми туморни маркери, такива като карциноембрионален антиген, от гледна точка на някаква рекомбинантна

токсичност, изчислена повишена доза. Обикновено дневните дози на тумор некрозисфактора при мишки са от 120 микрограма/ кг тегло при интравенозно приложение, за които е установено, че са нетоксични и ефикасни *in vivo*.

Предполага се, че тумор некрозисфакторът не е от видовете със специфична цитотоксична активност, така че тумор некрозисфактор, различен от човешки тумор некрозисфактор, например от конски или свински източници, може да бъде използван в терапията на човешки тумори. За предпочитане е да се използва тумор некрозисфактор от видовете, които се третират, за да се избегне потенциалното създаване на автоантитела.

За простота в примерите някои често използвани методики са дадени само реферативно.

Плазмидите са обозначени с малка буква р, предшествана и/или последвана от главни букви и/или номера. Изходните плаزمиди, които се използват, са търговски достъпни и са добре известни или могат да бъдат получени от такива достъпни плазмиди по известни методики. Други еквивалентни плазмиди, които са известни в тази област на техниката, също могат да бъдат използвани.

“Разлагане” на ДНК означава каталитично разцепване на ДНК с ензим, който действа само на някои области на ДНК. Такива ензими се наричат рестрикционни (ограничаващи) и местата, за които са специфични, се наричат рестрикционни места. “Частично разлагане” се отнася до непълно разцепване с рестрикционен ензим, т.е. подбрани са условията, които водят до разцепване при някои, но не при всички места за дадена рестрикционна ендонуклеаза в ДНК субстрат. Различните рестрикционни ензими, използвани съгласно изобретението, са търговски достъпни и условията за рестрикция, техните кофактори (съпътстващи фактори) и други изисквания са установени. Рестрикционните ензими обикновено се обозначават чрез съкращения, съставени от главна буква, последвана от други букви, и след това от номер, представляващ микроорганизма, от който всеки рестрикционен ензим обикновено се получава. Около 1 μ г плазмид или ДНК фрагмент се използва с около 1 единица ензим в около 20 μ л буферен

разтвор. Подходящите количества буфер и субстрат за всеки отделен рестрикционен ензим са определени от производителя. Времето за инкубиране обикновено е 1 час при температура 37°C, но то може да варира в зависимост от указанията на производителя. След инкубиране протеинът се отстранява посредством екстракция с фенол и хлороформ и разцепената с ензим нуклеинова киселина се извлича от водната фракция чрез утаяване с етанол. Разцепването с рестрикционен ензим рядко се следва от хидролиза с бактериална алкална фосфатаза на завършващите 5' фосфати за предотвратяване възможността двете места на разцепване на ДНК фрагмента да се циклизират и образуват пръстен (затворен), което би попречило на вмъкването на друг ДНК фрагмент при мястото на разцепване. Освен ако не е указано, разцепването на плаزمиди с рестрикционен ензим, не се следва от дефосфорилиране на 5' завършека. Използваните за дефосфорилиране методики и реагенти са известни /53/.

“Извличане” или “изолиране” на даден фрагмент на ДНК от разцепване с рестрикционен ензим означава разделяне на получения след разцепването продукт чрез полиакриламид гел, електрофореза, идентифициране на представляващия интерес фрагмент чрез сравняване на неговата подвижност с тази на маркери фрагменти на ДНК с известно молекулно тегло, отстраняване на частта от гела, съдържаща желанния фрагмент и отделяне на гела от ДНК. Тази процедура е известна /54, 55/.

“Southern Analysis” е метод, посредством който присъствието на ДНК редове в разцепена с рестрикционен ензим или в съдържащ ДНК състав се потвърждава посредством хибридизация към известен белязан олигонуклеотид или ДНК фрагмент. За целите на изобретението този анализ, ако не е указано друго, означава разделяне на продукта от разцепването върху 1% агароза, денатуриране и прехвърляне върху нитро-целулоза по метода на E.Southern /56/ и хибридизиране по известен начин /57/.

“Трансформация” означава въвеждане на ДНК в организъм, така че ДНК да може да се възпроизвежда като екстрахромозомен елемент или като съществен хромозомен елемент.

Ако не е указано друго, методът,

използван за трансформация на E.coli, е калциеводухлоридния метод на Mandel /58/.

“Лигатиране” се отнася до метод за образуване на фосфодиестерни връзки между два двойнонишкови фрагмента на нуклеинови киселини /59/. Ако не е указано друго, лигатирането може да се осъществи при използване на известни буфери и условия с 10 единици T4 ДНК лигаза (“лигаза”) на 0,5 μ г приблизително еквимоларно количество от ДНК фрагментите, които трябва да се свържат.

“Получаване” на ДНК от трансформирания организъм означава изолиране на плазмид ДНК от микробиалната култура. Ако не е посочен друг начин, може да се използва методът на алкалий /SDS/60/.

“Олигонуклеотиди” са полиокси-нуклеотиди с къса верига с една или две нишки, които са синтезирани по химически път по известни методи и след това са пречистени върху полиакриламидни гелове.

Примери за изпълнение на изобретението.

Пример 1. Анализ.

Специфичната активност на тумор некротизисфактора се определя чрез известен модифициран анализ на лизис на клетките /61/. Клетки от миши L-929 фибробласт (ATCC CCB 929) се култивират в подходящи тави (3040; Falcon Plastics, Oxnard, CA) при концентрация 30,000 клетки (обем 0,1 мл) на резервоар в присъствието на 1 μ г/мл актиномицин D и серийно разреждана опитна проба (0,125 мл). Клетките се инкубират във влажна атмосфера при температура 37°C с 5% въглероден двуокис. Опитната проба се взема след 18 часа, посевките се промиват и лизисът на клетките се открива посредством оцветяване на посевките с 0,5 % разтвор на кристал виолет в метанол: вода /1:4/ /обем:обем/. Краят на микротитруване на посевките се определя с помощта на автоматичен отчитащ уред Microelisa (Dynatech), настроен за абсорбция при 450 нм и трансмисия при 570 нм. Клетките, изложени на действието само на културалната среда, показват лизис 0% и същите, изложени на действието на 3М разтвор на гуанидинхидрохлорид, осигуряват в крайния момент 100% лизис. Една единица тумор некротизисфактор се определя като

количеството тумор некрозисфактор, когато анализът е осъществен в 0,125 мл обем), което е необходимо за 50% лизис на клетките.

Тумор некрозисфакторът се изследва и с анализ *in vivo*, който се осъществява посредством култивиране на MethA Sarcoma клетки (5×10^5 клетки) в CB6F₁ женски мишки, BALB/c x C57BL/6J F₁ в продължение на 7-10 дни и след това интратуморно се инжектира проба от тумор некрозисфактор. След 24 часа мишката се умъртвява посредством отстраняване на мозъка, туморите се отстраняват и некрозата се определя хистологично по известен метод [62].

Пример 2. Използване на PBLs или моноцитна клетъчна линия за синтез на тумор некрозисфактор.

Посята култура от HL-60 човешка промиелоцитна клетъчна линия, която има плътност на клетките 1×10^5 клетки/мл се култивира в 2-литрова въртяща се бутилка (890 см²) при използване на 500 мл RPMI 1640 среда (Irvine Scientific, Santa Ana, CA), съдържаща 10 mM HEPES, 0,05 mM β - меркаптоетанол, 100 единици/мл пеницилин, 100 μ г/мл стрептомицин и 10 % ембрионален телешки серум. След инкубиране три дни при температура 37°C, когато плътността на клетките достигне $8-12 \times 10^5$ клетки/мл, клетките се събират посредством центрофугиране при 1000 g за 10 мин, промиват се двукратно с RPMI 1640 среда, свободна от серум, и се прехвърлят в същата среда, както е описано по-горе, без серум при плътност на клетките $15-20 \times 10^5$ клетки/мл. Клетките се култивират в 2-литрова въртяща се бутилка в присъствието на 10 нанограма / мл РМА. След 16 до 24 часа клетките се отстраняват чрез филтриране през 3 μ м Sealkleen филтър (Pall Trinity Micro Corp. Cortland, NY). Бистрият филтрат се анализира за активност на тумор некрозисфактор и се използва за следващо пречистване и охарактеризиране. Тази методика дава около 400 единици тумор некрозисфактор единици/мл от супернатантната културална среда.

Човешки периферни кръвни моноцити също се използват за получаване на тумор некрозисфактор. Остатъци от плейтлитферезис, получени от American Red Cross, Boston, MA, се използват 24 часа след събирането им. Първоначалното разделяне на

моноцитите от еритроцитите се постига посредством центрофугиране с Ficoll-Нугауе градиенти при 1000 g за 30 мин. Събраните клетки на вътрешната повърхност се промиват трикратно с разсол, буфериран с фосфат. Моноцитите, произхождащи от всеки донор, се култивират отделно в 2-литрова въртяща се бутилка в свободна от серум RPMI 1640 среда при плътност на клетките $2,5 \times 10^6$ клетки/мл. Към всяка култура се прибавят по 1 μ г/мл Staphylococcal ентероксин В (SEB) и рекомбинантен тимозин d-I и клетките се инкубират във влажна атмосфера при температура 37°C с 10% въглероден двуокис. След 24 до 72 часа, в зависимост от донора, клетъчните супернатанти се събират и обработват по начин, подобен на този, описан при HL-60 клетъчна линия. Добивите от тумор некрозисфактор от културите варира в широки граници в зависимост от използваните индуциращи средства. Прибавянето на РМА към индукционната система, описана по-горе, повишава цитолитичната активност на клетъчните супернатанти. Клетъчните супернатанти съдържат едновременно и тумор некрозисфактор, и лимфотоксин (определяне на тумор некрозисфактора или лимфотоксина в смеси на тумор некрозисфактор и лимфотоксин се прави посредством анализ за лизис на клетката с опитни проби, предварително инкубирани със заешко неутрализиращо антитяло, за тумор некрозисфактор или лимфотоксин и определяне на остатъчната активност при анализ на лизис в L-929 клетката.

Пример 3. Хроматография със стъклени топчета с контролирана порьозност.

Тумор некрозисфактор от клетъчната култура се абсорбира в колона с пълнеж от стъклени топчета с контролирана порьозност (Catalogue № CPG 00350, Electro-Nucleonics fairfield, NJ), еквилибрира се с 10 mM натриевофосфатен буфер при pH 8,0, при постоянно разбъркване и при температура 4°C. На 5 л среда се използват 100 г стъклени перли (топчета). След разбъркване в продължение на 1 час перлите се оставят да се утаят и супернатантната се отдекантира. След това перлите се изливат в колона с размер 5x50 см при стайна температура, промиват се с 10 mM натриевофосфатен буфер при pH 8,0, съдържащ 1 M натриев хлорид. Тумор

некротизисфакторът се елуира от стъклените перли с 20 % етиленгликол в 10 mM натриевофосфатен буфер при pH 8,0, съдържащ 1M натриев хлорид. Профилът на елуирането на HL-супернатантата от колоната е показан на фиг. 1.

Пример 4.

DEAE целулозна хроматография.

Елуатът, получен от пример 3, се прилага към запълнена с DEAE целулоза 53 (Whatman) колона (2,5x20 см), еквилибрирана с 10 mM натриевофосфатен буфер при pH 8,0 и 0,01% Tween 20, при скорост на потока 500 мл/час. След като скоростта на потока стане 100 мл/час, се зарежда проба от $4,2 \times 10^6$ единици тумор некротизисфактор в 1,080 мл при температура 4°C. Колоната се промива с буфер за еквилибриране и се елуира с градиенти от 75 mM, 150 mM и 500 mM натриев хлорид в 10 mM фосфатен буфер (pH 8,0). Елуатът се следи за поглъщане при 280 nm. Получените резултати са отразени на фиг. 2.

Пример 5. Бърза протеинтечна хроматография.

Получената в пример 4 фракция с активен тумор некротизисфактор се концентрира и диализира с 20 mM TrisHCl pH 8,0, съдържаща 0,01 % Tween 20 и 1 mM натриев азид (буфер А) в Amicon клетка с разбъркване при използване на УМ-10 мембрана или други мембрани за диализа с молекулно тегло, под това на тумор некротизисфактора. Мембраната се промива двукратно с буфер А. Колона, напълнена с перли от заместена с кватернерни амониумни групи Sepharosa (9,8 μ M перли в 5x0,5 см колона; известна като Mono Q смола, Pharmacia) в устройство за бърза протеин-течна хроматография (FPLC) (Pharmacia), снабдено с програмно устройство за градиента (GP-250) и две помпи /P-500/, предварително се еквилибрира с буфери за диализа през байпасен тръбопровод при скорост на потока 1 мл/мин, както е описано в литературата /63/. Промивните течности и концентратът за диализа се зареждат в колоната, колоната се промива с буфер А и след това се елуира с линеен градиент на 40-75 mM натриев хлорид в буфер А. Линеините градиенти се програмират както следва: 0-5 мин еквилибриращ буфер, 5,1-15 мин 25 mM натриев хлорид, 15,1-25 мин 40 mM натриев хлорид, 25-60 мин 40-75 mM натриев хлорид

линеен градиент; 60-65 мин 75 mM натриев хлорид; 65, 1-70 мин 100 mM натриев хлорид; 70-80 мин 100-1000 mM натриев хлорид, линейни градиенти; 80-90 мин 100 mM натриев хлорид, 90,1-110 мин еквилибриращ буфер. Елуентът се събира под формата на 2-милилитрови фракции и се наблюдава за поглъщане при 280 nm, за проводимост и за активност тумор некротизисфактор. Резултатите са посочени на фиг. 3.

Пример 6. Хроматофокусиране.

Хроматофокусирането се осъществява при използване на Pharmacia Mono P колона (20x0,5 см) в FPLC система, както е описана в пример 5. Биологично активната тумор некротизисфракция, елуирана във фракции 37 до 45 в пример 5, се концентрира и диализира в Amicon клетка с разбъркване с УМ-10 мембрана срещу еквилибриращия колоната буфер, т.е., 0,025 M бис-Tris HCl, pH 6,7. Пробата се зарежда в Mono P колона при стайна температура през байпасен тръбопровод при скорост на потока 1 мл/мин. Колоната се промива с еквилибриращ буфер, докато абсорбцията при 280 nm се върне до базовата линия, и след това се елуира с линеен pH градиент, създаден чрез промиване на колоната със 7,5 % полибуфер 74 при pH 4,7 (Pharmacia). Едномилилитрови фракции се събират и се отчита абсорбцията при 280 nm и pH на изтичащия поток. Получените резултати са посочени на фиг. 4. Както се вижда от фиг. 4, изоелектричната точка на тумор некротизисфактора е около 5,3.

Пример 7. Препаративна SDS-полиакриламидгел електрофореза.

Петнадесет процентни полиакриламидгелове (11x16 см) с дебелина 1,5-3,0 мм се приготвят посредством видоизменената методика /64/. Два разтварящи и напластяващи гелове съдържат 0,1 % SDS и 0,05% Tween 20. Другите буфери и концентрации на омрежените реагенти са същите както за аналитичните SDS-PAGE гелове. Фракциите, съдържащи активен тумор некротизисфактор от примери 5 и 6, се събират, концентрират и диализират срещу mM Tris HCl, pH 7,0 съдържаща 0,005 % SDS в Amicon клетка при разбъркване и използване на УМ-10 мембрана. След отстраняване на диализирания концентрат мембраната се промива три пъти с проби, с малък обем, с

буфер (0,2% SDS, 0,02 % Tween 20,30% глицерин, 0,03 M Tris HCl, pH 6,8,0,005% багрило за проследяване). Диализираният концентрат и промивните течности се събират (общ обем 1-4 мл), по желание се прибавят меркаптоетанол за създаване на SDS-PAGE редуциращи условия и пробата се зарежда в широка яма в напластяващия гел. Малки ямички, съседни на ямичката за пробата, се използват за предварително оцветени маркери за молекулно тегло от фосфорилаза (94 K), говежди серумен албумин (67K), овалбумин (43K), карбонова анхидраза (30K), инхибитор на соев трипсин (20K) и лизозим (14,4 K). Геловите се поставят в BioRad вертикална система за електрофореза, охладена до температура 12°C, при постоянен ток 20 mA на мм от дебелината на гела, докато бележщото багрило достигне долната страна на гела.

След електрофорезата една от стъклените плочки се отстранява от гела и се отбелязва положението на маркерите за молекулно тегло. Ивицата, съдържаща приложената проба от тумор некрозисфактор, след това се нарязва на 0,25 см секции в съответствие с молекулните тегла на протеиновите маркери. След това тези ивици (парчета) гел се поставят в полипропиленови тръби, съдържащи 1-2 мл 10 mM амониев бикарбонат и 0,01 % Tween 20, pH 8, и се оставят да се елуират в продължение на 16 ч при температура 4°C. След това елуатите се анализират за тумор некрозисфактор активност. Получените резултати са показани на фиг.5. Молекулното тегло на тумор некрозисфактора върху SDS гел е около 17,000 както при редуциращи, така и при нередуциращи условия, показвайки еднородна молекула.

Протеинът се извлича от елуата на гелните късове, свободен от соли и вещества с ниско молекулно тегло, чрез следната обработка: приготвят се малки колонии, съдържащи 0,2 мл Sep-raK C18 смола, които предварително са промити с ацетонитрил, 1-пропанол, 1% трифлуороцетна киселина (TFA) и дестилирана вода и след това са еквилибрирани с 10 mM амониев бикарбонат, съдържащ 0,01 % Tween 20, pH 8,0. Елуатът от гела се зарежда в колоната и изтичащият поток се събира. След това смолата се промива приблизително с 5 мл дестилирана вода, 0,1

% TFA за отстраняване на свободните аминокиселини и буферните соли. Тумор некрозисфакторът се елуира от смолата с 1 мл 50 % 1-пропанол в 0,1 % TFA. Следва елуиране с по 1 мл от 50 % 1-пропанол в 1% TFA и 90 % 1-пропанол в 1% TFA, като протеинът обикновено се елуира с първия буфер. При този етап около 80 % от биоактивността на тумор некрозисфактора се инактивира. Така полученият тумор некрозисфактор може да се използва за анализ на последователностите, но за предпочитане е за тази цел да се използва изтичащият поток от HPLC, описан в пример 8.

Пример 8. Високоэффективна течна хроматография.

Молекулното тегло на природния интактен тумор некрозисфактор се определя посредством гелна хроматография, високо налягане, която се осъществява при стайна температура при използване на TSK G 2000 SW гел HPLC колона (Alltech Associates Deerfield, IL) 7,5x60 мм. Проба от 1 мл пречистен тумор некрозисфактор, получен в пример 5, съдържащ приблизително 1 μ г протеин и 15,600 единици изокритично, се елуира от съдържащата гел колона при скорост на потока 0,5 мл/мин, с 0,2 M натриевофосфатен буфер, pH 7,0. Колоната се калибрира с говежди серумен албумин (MW 66,000), овалбумин (MT,000); говежда карбонова анхидраза B (MT 29,000) и лизозим (MT 14,000). Получават се фракции от по 1 мл и се анализират за тумор некрозисфактор активност. Елуираната фракция, която показва тумор некрозисфактор активност, е с молекулно тегло $45,000 \pm 6,000$ (фиг.6).

Пример 9. HPLC обратна фаза.

Тумор некрозисфакторът се пречиства също и чрез HPLC обратна фаза при използване на C4 Synchronapak колони на Water's Associates Inc., хроматографска система по известен начин /65/. Пиковите на протеина се откриват при 210 nm и при 280 nm след елуиране с линеен градиент от 1 до 23 % обем/обем 1-пропанол в 0,1 % водна TFA (тетрафлуороцетна киселина) в първите 15 мин и с линеен градиент 23-30% обем/обем 1-пропанол в 0,1 % TFA през следващите 15 мин при скорост на потока 1 мл за минута. Пиковите се изследват за цитолитична активност. Използваните за елуиране на тумор

некрозисфактора от колоната С4 органични разтворители понижават неговата активност около 80%. Пречистеният по този метод тумор некрозисфактор се суши във вакуум и след това се подлага на анализ на редовете на аминокиселините и на редуване. Получените резултати са отразени на фиг. 7. Фиг. 7 показва, че полученият в изтичащия поток в пример 5, тумор некрозисфактор съдържа биологично неактивни протеинови онечиствания, които се елуират около 16 и 19 мин, време на задържане. Биоактивният поток от С4-RP-HPLC е хомогенен в значителна степен по отношение на аминокиселинната последователност.

Пример 10. Определяне на частична аминокиселинна последователност за тумор некрозисфактора.

Тумор некрозисфакторът се разцепва (усвоява) с трипсин както следва: хомогенният тумор некрозисфактор от пример 9 се разтваря, суши и разтваря отново в 100 mM амониево бикарбонатен буфер, pH 8, съдържащ 5% тегло/тегло ТРСК трипсин (Worthington Biochemicals/), 1 mM калциев двухлорид 0,01% Tween 20 при отношение на ензим към субстрат 1:20, инкубира се при температура 37°C, прибавят се допълнителни 5% тегло/тегло трипсин и по-нататък хидролизната смес се инкубира в продължение на 12 ч при температура 37°C. Реакционната смес се подава в С4 HPLC, както е описан по-горе, за да се разделят пептидните фрагменти. Резултатите са посочени на фиг. 8. Общо се наблюдават 9 фрагмента (фрагменти 2 и 2' са елуирани заедно при пика, обозначен с Т2 на фиг. 8). Предполага се, че един допълнителен десети фрагмент не е задържан върху колоната. Аминокиселинните последователности за интактния тумор некрозисфактор, получен в пример 8 и 9, и хидролизираните с трипсин фрагменти, получени съгласно този пример, се определят посредством автоматично секвенционално разграждане на Edman при използване на модифициран Бекманов секвентор, модел 890В, снабден със студени уловители. В купа се използва полибрен (1,25 мг) като носител. Базирано на състава на аминокиселините на интактната молекула, молекулното тегло на интактния тумор некрозисфактор е 17,000. Тази стойност съответства на данните от SDS-PAGE и представлява потвърждение за отсъствието на

гликозилиране.

Пример 11. Синергизъм на тумор некрозисфактора и γ -интерферона.

Клетки на миша меланома В16 (Mason Research Worcester, MA), клетъчна линия C57Bl/6, се посяват в микротитърно петри при 5000 клетки/яма и се инкубират в продължение на 4 ч при 37°C в 5% въглероден двуокис в овлажнен инкубатор преди прибавянето на лимфокините. Полученият в пример 1 тумор некрозисфактор се пречиства до значителна хомогенност с помощта на HPLC и се определя количеството посредством неговата активност в описания по-горе биоанализ за цитолиза на L 929 клетки. По аналогичен начин пречистен рекомбинантен миши γ -интерферон /66/ се изследва за антивирусна активност срещу ЕМС инфектирани клетки /67/. Мишият γ -интерферон и човешкият тумор некрозисфактор поотделно се разреждат до степени, показани на фиг. 10. Първоначално в обозначените ямички се прибавя γ -интерферонът и непосредствено след него се прибавя и разреденият тумор некрозисфактор до краен обем 0,2 мл /ямичка. След инкубиране в продължение на 72 ч клетките се оцветяват с 0,5 % кристал виолет, разтворен в 20 % метанол. Получените резултати са посочени на фиг. 10. В16 е относително устойчив на тумор некрозисфактора или на -интерферона, използвани самостоятелно; при 1000 единици /мл тумор некрозисфактор не се наблюдава визуално цитолизис. Обаче при прибавянето на съвсем малки количества γ -интерферон (от порядъка на 5 единици/мл се наблюдава цитолиза.

Пример 12. Изолиране на РНК носители.

Общо от HL 260 клетъчни култури (след 4 часа индуциране РМА) или от периферни кръвни моноцити, култивирани по описания в пример 2 начин, се екстрахира значително количество РНК, както е посочено в литературата /68/. Клетките се събират посредством центрофугиране и след това се суспендират отново в 10 mM натриев хлорид, 10 mM Tris - HCl, pH 7,5, 1,5 mM магнезиев двухлорид. Клетките се лизират чрез прибавяне на NP-40 (крайна концентрация 1%) и ядрата се събират чрез центрофугиране. Супернатантата, съдържаща обща РНК, след

това се пречиства чрез многобройни екстракции с фенол и хлороформ. Водната фаза се прави 0,2 моларна в натриев хлорид и след това общата РНК се утаява посредством прибавянето на два обема етанол. Обикновено добивът от 1 г култивирани клетки е 6 мг обща РНК. Полиаденилирана мРНК (около 100 µг) се получава върху олиго (dT) целулоза по познат начин /69/.

Пример 13. сОНК енциклопедия.

Превръща се 7,5 µг от поли /А/+ мРНК, получена в пример 12, в двойнонишкова сДНК посредством последователното действие на обратна транскриптаза, ДНК полимераза Klenow фрагмент и si нуклеаза /70/, /71/. От полиакриламиден гел се изолира около 80 нанограма сДНК, която има повече от 600 bp по дължина. Синтетичната ДНК адаптираща последователност 5' A A T T C A T G C G T T C T T A C A G 3' 3' GTACGCAAGAATGTC 5' се свързва към сДНК за създаване на съвместим EcoRI завършек. По обичайния начин адапторът се синтезира химически като две отделни вериги, 5' краят на една от веригите се фосфорилира с полинуклеотидкиназа и двете вериги се съединяват. След това сДНК (20 нанограма) се изолира отново от полиакриламиден гел, вмъква се посредством лигатиране в разцепен с EcoRI λgt-10, обвит във фагови частички, и се размножава в E.coli вид C600 hfl/72/ или в друг известен вид, подходящ за λ-фагово размножаване. Получава се сДНК многостранна енциклопедия с около 20,000 независими клона.

Пример 14. Приготвяне на деоксиолигонуклеотидна проба за тумор некрозисфактор сДНК.

42 нуклеотидна ДНК хибридизационна проба е базирана на предварителна аминокиселинна последователност на тумор некрозисфактора трипептид TD-6 /E-T—P-E-G-A-E-A-K-P-W-Y-E-K-/ , обозначен на база публикуваните честоти на използване на кодони /73/, на кодона на γ-интерферон /74/ и на човешки лимфотоксин. Предварителната последователност е погрешна (крайното К би трябвало да бъде Р). Въпреки това тази последователност може успешно да служи за проба. Синтетичната проба има следната последователност 5' d GAAACCCCTGAAGGGGCTGAAGCCAAGCC

СТGGTATGAAAAG 3' и е синтезирана по известен начин /75/. Пробата се фосфорилира с / γ -³²P/ АТР и Т4 полинуклеотидкиназа, както е описано в /76/.

Пример 15. Идентифициране на сДНК клон, съдържащ тумор некрозисфактор кодиращи последователности.

Около 200,000 рекомбинантни фага от λgt 10 многостранни сДНК се подбират чрез ДНК хибридизация при използване на ³²P-белязания 42-нуклеотид, получен в пример 14 при условията, описани в /77/ или /78/, /79/, /80/. Девет различни клона се хибридизират с пробата и плаката се пречиства. След това се приготвя ³²P-белязана сДНК при използване на мРНК от неиндуцирани HL-60 клетки. ДНК от седем от тези девет фагови клона не може да се хибридизира с тази "неиндуцирана" проба и затова се определят като тумор некрозисфактор сДНК последователности. С ДНК клонът, съдържащ най-големия инсърт (вмъкнат отрязък) се обозначава като λ 42-4. Последователността на този инсърт се определя по метода на дидеоксизавършваща верига /81/, /82/ след субклониране във вектора M13mp8 /83/.

сДНК последователността, получена за 42 -4, съдържа цялата кодираща област за зрелия тумор некрозисфактор и част от неговия сигнален пептид. Правилната ориентация и правилната посока на четене на ДНК се постига посредством сравняване с аминокиселинната последователност на три пептида Т4 на тумор некрозисфактора. Аминозавършващият остатък валин на тумор некрозисфактора, определен чрез определяне последователността на протеина, се означава като аминокиселина 1 и е последвана от допълнителни 156 аминокиселини, без да се брои стопкодонът в правилна посока на четене. Изчисленото молекулно тегло е 17,356 далтона.

Пример 16. Идентифициране на сДНК клона, съдържащ пълния предтумор некрозисфактор кодиращ последователности.

сДНК клонът λ42-4 съдържа цялата кодираща област на зрелия тумор некрозисфактор, но няма пълен сигнален пептид, кодиращ последователност (липсва инициращ кодон). За получаване на липсващата информация се синтезира химически хескадекануклеотид dTGGATGTTTCGTCCTCC (допълнителен към нуклеотиди 855 до 870

фиг.10). Този нуклеотид се присъединява към мРНК, получена в пример 12, и след това се синтезира сДНК при използване на метода от пример 13. Новата многостранна от около 200,000 сДНК клона се приготвя в γ gt10 по метода, описан в пример 13. Тази многостранност се подбира посредством хибридизационен анализ при използване като проба γ 42-4 сДНК инсърт, който е 32р-белязан. Получават се 16 позитивни клона, като най-дългият (γ 16-4) съдържа сДНК инсърт и включва 337 вр след 5' в сравнение с γ 42-4 инсърта. Съставената последователност на тумор некрозисфактор сДНК инсърти на γ 16-4 (нуклеотиди 1-870) и γ 42-4 (нуклеотиди 337-1643) е показана на фиг. 10.

Пример 17. Конструирание на експресионен вектор за директна експресия на тумор некрозисфактор.

Методиката, използвана за експресиране на сДНК последователност за тумор некрозисфактора, получен в пример 15, е посочена на фиг. 11. Фагът γ 42-4 от пример 15, съдържащ цялата последователност кодираща зрял тумор некрозисфактор и част на предполагаемия тумор некрозисфактор секретирал лидер, се разцепва ензимно с EcoRI и се извлича фрагмент с приблизително 800 bp, съдържащ тумор некрозисфактор кодираща област. Този фрагмент се разцепва ензимно с AVa I и HindIII и се извлича фрагмент с 578 bp (обозначен "С" на фиг. 11).

Този фрагмент кодира тумор некрозисфактор аминокиселините от 8 до 157.

Приготвят се два синтетични деоксиолигонуклеотида (обозначени като фрагмент "В" на фиг. 11) (виж изграждането на адаптираща последователност в пример 13), които включват Xba I съвместим край при 5' края, AVa съвместим завършек при 3' края, инициращ кодон и кодони за първите седем аминокиселини на тумор некрозисфактора. Кодоните за тези аминокиселини са избрани на базата на E. coli предпочитание. ООТТ последователността, нагоре от стартовия кодон, се подбира за правилно разполагане на стартовия кодон от trp рибозома свързващата последователност и в комбинация с аминокиселинните кодони за елиминиране на потенциален пръстен РНК носител (месенджер).

Сегменти В и С след това се присъединяват при тристепенно лигатиране с pBR322 производно, съдържащо trp промотиращата последователност с Shine-Dalgarno последователност на trp водещия пептид /84/. Производното е получено или предвидено да съдържа единствени Xba I Hind III места между trp промотора и Tet^R гена. pL Ttrp I/85/ или pTrp ETA /86/ са подходящи изходни вектори от този тип, въпреки, че могат да се създадат и други от pBR322, trp промотора и всякакви необходими синтетични линкери. pBR322 и плазмидите, съдържащи trp промотора, са търговски достъпни. pBR322 частта на избрания вектор може да има AVaI-PvuII сегменти от bp 1424 до 2065 (обозначени като "ХАР" в името на плазмид). Всеки от посочените по-горе плаزمиди едновременно се разцепва ензимно с Xba I r Hind III и се извлича големият векторен фрагмент. Този фрагмент и фрагменти В и С се лигатира с T4 ДНК лигаза и лигатираната смес се използва за трансформиране на E.coli 294 % ATCC 31446/. Подбират се устойчиви на ампицилин колонии, извлича се ДНК плазмид и се охарактеризира посредством мепинк (изготвяне на карта) с рестрикционна ендонуклеаза и броене на последователностите на ДНК. pTrpХАРТНФ се получава и съдържа В и С инсъртите.

Пример 18. Експресия на тумор некрозисфактор в E.coli ATCC 31446, който е трансформиран с pTNDtrp, се култивира в M9 среда, съдържаща 20 μ г/мл ампицилин, и културата се размножава до $A_{550}=0.3$. Прибавя се индолоцетна киселина до достигане на крайна концентрация 20 μ г/мл и културата се оставя да се развива до $A_{550}=1.10$ мл, клетките се концентрират и се суспендират отново в буфериран с фосфат разсол. Клетките се облъчват и се разреждат за определяне на тумор некрозисфактора по описания в пример 1 метод за анализ. От 1 мл култура се получават приблизително 10^5 единици активност. Тази активност се неутрализира чрез предварително инкубиране със заешки антисерум от зайци, имунизирани срещу човешки тумор некрозисфактор.

Пример 19. Експресия на тумор некрозисфактор в E.coli

Този метод се предпочита пред описания в пример 18.

За предпочитане, приемникът за използване с посочените по-горе вектори е необратим тонА *E.coli* вид. Такива видове са устойчиви на бактериофаги и затова са много по-подходящи за култивиране в големи мащаби. Описан е метод за създаване на такъв вид *E.coli* W3110 е обработен с λ : Tn10, λ -бактериофаг, съдържащ елемента Tn10, който може да се прехвърля, за създаване на Tn10 пръстен на *E.coli* W3110 /87/.

E.coli W3110: : Tn10 пръстен се култивира в L културална среда при температура 37°C до плътност на клетките около 1×10^9 /мл. Центрофугира се 0,5 мл от културата и получените пелети се суспендират отново в 0,2 мл λ phi 80 (или TI) лизат, съдържащ 7×10^9 pfu. Фагът се оставя да се адсорбира в продължение на 30 мин при температура 37°C. След това суспензията се разпръсква върху блюда, допълнени с тетрациклин (15 μ г/мл). След инкубиране в продължение на 1 нощ при температура 37°C леко розовите колонии се изливат в 3 мл L културална среда, култивира се една нощ при температура 37°C, промива се двукратно и се суспендира отново в L културална среда. Тази култура се инфектира с бактериофаг PI Kс и фаговият лизат се извлича /88/.

E.coli AT982 (№ 4546, *E.coli* Genetic stock Center, Neu Haven, Conn) се превръща в устойчив на тетрациклин с помощта на този PI Kс лизат. Трансдуктантите се подбират върху блюда с L културална среда, допълнена с тетрациклин (15 μ г/мл) и (40 μ г/мл) дап (диамино пимелинова киселина). Получените в резултат трансдуктанти се подбират за устойчивост на тетрациклин и за регенериране на дапгена (dar^+ и tet^R). dar^+tet^R трансдуктантите след това се изследват за устойчивост на λ phi 80 (или TI).

След това се правят PI Kс лизати на dar^+ , tet^R λ phi 80 (или TI) устойчивите видове. Лизатите се използват за трансдуциране на *E.coli* W3110 към устойчивост на тетрациклин. Трансдуктантите се подбират за устойчивост на λ phi 80 (или TI).

От W3100 *fhuA*: : Tn10- λ phi 80R трансдуктанти се подбират чувствителни към тетрациклин изолати /89/. Тези изолати се проверяват за фаг λ phi80 устойчивост и чувствителност спрямо тетрациклин след пречистване на единична колония.

ДНК се изолира от няколко чувствителни спрямо тетрациклин, λ phi 80 фаг устойчиви мутанти и се разцепва ензимно с SstII. Разцепената с SstII ДНК се характеризира с помощта на Southern методика при използване на белязан с радиоактивен елемент и разцепен с SstII λ :Tn10 ДНК като проба за определяне, ако Tn10 е изрязан /90/. Един от чувствителните спрямо тетрациклин изолати, показва, че е загубил две от Tn10 хибридизационните вериги в сравнение с хибридизацията между ДНК от λ :Tn10 и парентералната W3110 *fhuA*: : Tn10 λ phi 80 R. Трета хибридизационна ивица има променена подвижност, показваща, че се е появило заличаване, причинено от изрязване на Tn10.

SDS-гел електрофореза на препаратите от вида с изрязан Tn10 доказва, че ивицата, смятана, че е *fhuA* протеин, има променена електрофоретична подвижност в сравнение с дивия тип *fhuA* протеин. Полученият в резултат протеин е нефункционален като λ phi 80 фагов рецепторен протеин. Втори независим вид, който също претърпява Tn10 изрязване, не показва *fhuA* протеин при SDA гела.

Нито един от тези видове не показва връщане към устойчивост спрямо тетрациклина или към чувствителност спрямо λ phi 80, което показва, че има изрязване на целия или част от Tn10 транспозон заедно с частично или пълно заличаване на *fhuA* гена. За предпочитане един от тези W3110 видове /NL 160/ се използва като приемник за TNF кодиращи средства, описани тук.

NL 160 се трансформира с p|XARTNF и се инокулира в 10 литра, pH 7,4 в среда със следния състав:
| |

Компонент	Мярка, г/л
Амониев сулфат	5,0
Дикалиев кисел фосфат	6,0
Мононатриев кисел фосфат	3,0
Натриев цитрат	1,0
L-триптофан	0,2
Nz амин AS	4,0
Дрожден екстракт	4,0
Магнезиев сулфат	1,2
Глюкоза	25,0

Разтвор на редки елементи
(железни, цинкови, кобалтови,
медни, борни и
манганови йони).
Тетрациклин

0,5 л

1,0 г

5

Глюкозата се подава към културата със
скорост 1 г/мин, когато A_{550} на културата
достигне 20. Ферментацията се осъществява
при температура 37°C, докато A_{550} достигне 136
(около 20 часа). Културата се центрофугира
до получаване на клетъчна паста и след това
пастата се екстрахира в продължение на 30
мин, при pH 8,0 и стайна температура с буфер,
съдържащ 50 mM трис, 10 mM ЕДТА
(етилендиаминтетраоцетна киселина), 1000 mM
натриев хлорид, 2000 mM карбамид и 0,1 % β -
меркаптоетанол. Екстрактът се разрежда и
се анализира по описаната в пример 1 методика.
При този анализ се установява, че 1×10^8
единици активност на тумор некрозисфактор е
еквивалент на 1 мг тумор некрозисфактор. До
около 2 г тумор некрозисфактор се получават
от литър култура. Определянето на
аминокрайщата показва, че около 75 до 86 %
тегл. е валиламинокраят (зрял тумор
некрозисфактор), а останалото е мет-TNF. По-
нататък в допълнение на високите експресионни
нива, протеинът не присъства в рефрактилните
тела, нито по някакъв друг начин показва да е
токсичен спрямо клетките, което става ясно от
изключително високата клетъчна плътност,
която се получава.

Пример 20. Изграждане и експресия на
мутантен тумор некрозисфактор ген.

Примерът се осъществява, като се
следват методиките от примери 17-18, с изкл.
на това, че олигонуклеотидният фрагмент В се
синтезира с хистидин кодон САТ на мястото
на аргинин 6 кодон CGT. Експресира се
мутантен тумор некрозисфактор.

Пример 21. Изграждане и експресия на
друг мутантен тумор некрозисфактор ген.

При този пример се повтаря методиката,
описана в примери 17-18, с олигонуклеотиден
фрагмент В, кодиращ левцин (СТТ) на мястото
на остатъчния 2-аргининкодон. Получава се
около 1200 мг активност на зрял тумор
некрозисфактор на литър култура при
първоначалните опити. Необработен тумор
некрозисфактор не се открива в културата.

Пример 22. Изграждане на вектор,
кодиращ тумор некрозисфактор, присъединен
с втора сигнална последователност.

Последователността на *E. coli*,
топлоустойчив ентероксин ген STII, е показана
на фиг. 12. При този пример фрагмент,
съдържащ STII секретирания сигнал, и Shine-
Dalgado последователност, се свързват надолу
от *E. coli* алкал-нофосфатазния промотор. STII
сигналят е последван в 3' посоката от
синтетичен олигонуклеотид, който доставя
кодони за първоначалните седем
аминозавършващи аминокиселини на тумор
некрозисфактора и остатъкът на кодиращата
последователност на тумор некрозисфактора.
Всичко споменато по-горе е събрано в pBR322
вектор.

pWM501 /91/ съдържа STII гена,
обозначен на фиг. 12. pWM501 се разцепва
ензимно с XbaI и NsiI и се изолира
приблизително 90 вр фрагмент. Този фрагмент
също би могъл да бъде синтезиран по известни
методи (фрагмент А).

pBR322-Trp плазмид, описан в пример
17 (p20KLT), се разцепва ензимно с XbaI и
Hind и се извлича голям векторен фрагмент
(фрагмент В). Този фрагмент съдържа *E. coli*
източник на репликация (възпроизводство) и
ген, осигуряващ фенотипа на устойчивост
спрямо ампицилин.

Синтезира се синтетичен
олигонуклеотид, като двете вериги се
присъединяват до получаването на следната
структура (рестрикционното място, лепливите
крайща и аминокиселините, кодирани
посредством олигонуклеотида, също са
обозначени).

VAL APG SER SER SEHARG THR
5' GTA CGT TCT TCT TCT CGT ACT 3'
ACGT CAT ACG AGA AGA AGA GCA TGA
GGCT
NsiI AVal

Този фрагмент е обозначен като
фрагмент С.

pTNF trp от пример 18 се разцепва
ензимно с AVal и Hind III. 578 вр AVal-Hind
III фрагментът (фрагмент В) се извлича. Той
съдържа целия тумор некрозисфактор,
кодиращ последователност, с изключение на
първите седем аминокиселини.

Изгражда се ДНК последователност, включваща *E. coli* алкална фосфатаза (AP) промотор, свързан към хетероложен Shine-Dalgado (S.D) ред (*trp*), Който има и *EcoRI* и *XbaI* краища. ДНК фрагмент, съдържащ част от AP промотора, се изолира от плазмид рНІ-І /92/, въпреки че могат да бъдат използвани всякакви подходящи източници, съдържащи AP промотор ДНК. рНІ-І се разцепва ензимно с *HpaI* до отваряне на плазмид, синтетичен *EcoRI* линкер,

GAATTTCGAATTC

CTTAAGCTTAAG се свързва към плазмид и свързаният плазмид се разцепва ензимно с излишък от *EcoRI* за отцепване на всички *EcoRI* места и с недостатъчна *RsaI* активност, за да се отцепят само частично всички *RsaI* места (*EcoRI* и *RsaI* етапите могат да бъдат осъществени последователно вместо едновременно). Извлича се 420 вр фрагмент, съдържащ AP промотора, при *EcoRI*-*RsaI* частичното разцепване.

Получава се *trp* S.D. последователност по следния начин. Плазмид или организъм, съдържащ *trp* промотор /93/ се разцепва ензимно с *XbaI* и *RsaI* и се извлича фрагмент с 30 вр, който съдържа *trp* S.D. последователността. Този фрагмент се присъединява към фрагмента с 420 вр, съдържащ AP промотора, до получаването на 450 вр *EcoRI*-*XbaI* фрагмент Е. Фрагментът Е има следната нуклеотидна последователност.

EcoRI

GAATTCAACTTCTCCATACTTTGGATAAGG
AAATACAGACATGAAAAATCTCATTCGCTGAG
TTGTTATTTAAAGCTTGCCCAAAAAGAAGAAGAGTCGA
AAGAACTGTGTGCGCAGGTAGGAAGCTTTTGGG
GATTATCGTCACTGCAATGCTTCGCAATATGGCG
CAAAATGACCAACAGCGGTTGATTGATCAGG
TAGAGGGGGCGCTGTACGAGGTAAAGC
CCGATGCCAGCATTCCTGACGACGATA
CGGAGCTGCTGCGGATTACGTAAAGAAGTTAT
TGAAGCATCCTCGTCAGTAAAAAGTTAATCTT
TTCAACAGCTGTCATAAAGTTGTCTCGGCCGAGACTT
Irp S.D.xbaI
ATAGTCGCTTTGTTTATTTTAAATGTTATTTGTAC
GCAAGTTCACGTAAAAAGGGTATCTAGA

Фрагменти А, В, С и D се присъединяват при четириетапно присъединяване и лигатираната смес се използва за трансформиране на *E. coli* 294. Трансформантите се идентифицират посредством

растеж върху LB посевки, съдържащи ампицилин. От трансформантната колония се изолира плазмид *trps* TIITNF. Този плазмид се разцепва ензимно с *XbaI* и *EcoRI* за отстраняване на *trp* промотора и след това се присъединява към дългия 450 вр *EcoRI*-*XbaI* фрагмент Е, съдържащ *E. coli* алкална фосфатаза промотор. Полученият в резултат плазмид се нарича рAPSTIITNF.

Пример 23. Експресия и обработване на тумор некротизисфактор, присъединен с вторична сигнална последователност.

E. coli NL160 се трансфектира с рAPSTIITNF и се инокулира в 10 л, рН 7,0, среда със следния състав:

Компонент	Мялка, г/л
Амониев сулфат	5,0
Дикалиев кисел фосфат	2,6
Мононатриев кисел фосфат	1,3
Натриев цитрат	1,0
Калиев хлорид	1,5
NL амин AS	5,0
Дрожден екстракт	2,0
Магнезиев сулфат	1,2
Глюкоза	25,0
Разтвор на редки елементи (железни, цинкови, кобалтови, молибденови, борни и манганови йони)	0,5 мл
Ампицилин	20,0 мг

Ферментацията се осъществява по начина, описан в пример 19, с изкл. на това, че се постига A_{330} около 140. В този момент съдържа около 400 мг тумор некротизис фактор (литър, около 70-80 тегл.% от които са правилно обработени до зрял протеин, както се доказва с електрофорезни гелове.

Приблизително същата активност тумор некротизисфактор се извлича при пълна екстракция на клетките по метода, описан в пример 19, установено посредством осмотичен шок на клетките.

Пример 24. Изграждане и експресия на допълнителни производни на тумор некротизисфактора.

Мутанти, производни на аминокиселинни последователности на тумор некротизисфактора от фиг. 10, се приготвят, за да повишат периода на полуразпадане *in vivo*, да повишат цитолитичната активност, да

повишат чистата диференциална цитолитична активност спрямо туморните клетки в сравнение с нормалните клетки, да подготвят тумор некрозисфактор имуногени за създаване на анти-TNF антитела за диагностични цели, да се създадат единствени места за ковалентна модификация (например белязан ензим е ковалентно свързан при приготвянето на EMIT или ELISA диагностични реагенти) и за променяне на физическите свойства на тумор некрозисфактора, например неговата разтворимост, PI и др. подобни. Определянето на желаната активност в избраните производни става по обичайния скрининг с подходящи известни методики за анализ.

За предпочитане тумор некрозисфакторът и неговите производни не включват тумор некрозисфактор, който има последователност, съответстваща на този на неprimатите, като за предпочитане е да няма аминокраища на неprimатите, като за предпочитане е да няма аминокраища на неprimати, например десValarg аминокраищата, характерни за това, което се описва като заешки тумор некрозисфактор, нито аминокравършеци на тумор некрозисгена, идентифициран, че има последователността: Val-Arg-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-Val-Ser-Val-Ala-Asn-Pro-Ala-Ala-Glu-Gly-/94/.

Следният метод, основан на известен метод /95/, може да бъде приложен за получаването (изграждането и експресията) на всеки мутантен тумор некрозисфактор ДНК последователности, съдържащи тихи мутации и/или кодиращи мутантен тумор некрозисфактор. За краткост производните се илюстрират с представители, при които Arg 32 е превърнат в хистидил (заместване), His73 е заличен (заличителна мутация) и левцин е свързан към Leu157 (вмъкване). Разбира се, всички други мутантни видове се създават по същия начин.

Други методи, подходящи за създаването на тиха или екопресирана мутация в тумор некрозисфактор - кодиращата ДНК, са известните в тази област на техниката методи. например, мутантната ДНК се изгражда посредством обикновено химическо синтезиране на цялата последователност или посредством синтезиране на част от последователността и лигирането ѝ до останалото от желаната ДНК. Химическият синтез на ДНК има предимството,

когато изследователят иска да приготви мутанта директно без първоначално получаване от естествени източници ДНК, кодираща тумор некрозисфактор. Обикновено изходната ДНК кодира естествената аминокиселинна последователност, включително нейните варианти, и от нея е желателно да се приготвят някои производни мутанти.

Желателно е при приготвяване на ДНК, кодираща мутантни производни на тумор некрозисфактора, да не се правят промени на кодоните, които създават възможност за транскрибираната от това мРНК да образува здрави и пръстенни структури. Избягването на такива структури обикновено има за резултат повишаване на добивите. В допълнение, предпочитаните кодони от трансформанта приемник трябва да се използват по същата причина.

Подходяща изходна ДНК е EcoRI-Hind III фрагмента на ptrpXAPTNF (получен в пример 17), получен посредством редуващо се разцепване с EcoRI и Hind III, последвано от изолиране на тумор некрозисфактор ген съдържащия фрагмент. Този фрагмент включва trp промотора и структурния ген за метионил тумор некрозисфактор. За получаването на еднонишково копие на този ген, подходящо за мутагенеза, EcoRI-Hind III фрагментът се клонира в полилинкер мястото на фага M13 mp8 RFDNA/96/; "RF" означава възпроизводим от фага; този фаг е търговски наличен. Една аликвотна част от разцепената с EcoRI-Hind III смес се прибавя към реакцията за свързване, съдържаща 10 нанограма M13 mp8 RF-ДНК6, която предварително е ензимно разцепена с EcoRI и Hind III. След инкубиране при стайна температура в продължение на 2 ч, лигатиращата смес се използва за трансформиране на E.coli JM103 (търговски достъпен вид; може също да се използва и JM101). Трансформираните клетки се посеват с горен агар, съдържащ X-Gal (дибромдихлориндолилгалактозид) и IPTG (изопропилтиогалактозид). Бактериални култури (1мл), инфектирани с фаг, избран от безцветните плаки, се използва за изолиране на M13 mp8/TNFRI-ДНК с помощта на методиката на минискрин /97/. Полученият в резултат рекомбинантен фаг M13 mp8/TNF носи кодиращата верига за тумор

некрозисфактор гена.

За странично насочените мутагенези олигонуклеотиди (мутагенезни олигомери) се синтезират с последователност, допълнена с по 15 вр на всяка от страните от мястото на мутация, както е показано на следните диаграми, където N означава допълнителните бази и M означава нуклеиновата киселина, която трябва да се вмъкне, заличи или замести. Вмъкванията или заличаванията обикновено се осъществяват в групи 3 по начин да се задържи долната част от гена във фаза.

За залича-

ване: олигомер ДНК $/N_{15}/N_{15}$
вектор ДНК $/N_{15}/M//N_{15}$

За замест-

ване: олигомер ДНК $/N_{15}/M//N_{15}$

За замест-

ване: олигомер ДНК $/N_{15}/M_1/N_{15}$
вектор ДНК $/N_{15}/M_2//N_{15}$

За вмък-

ване: олигомер ДНК $/N_{15}/M//N_{15}$
вектор ДНК $/N_{15}/N_{15}$

M₁ означава база или идинолигомер, който не е допълнен до базата, или олигомер M₂ означава последователността на желания мутант. Приготвят се също олигомери, които правят повече от един тип мутации едновременно.

Нечувствителният олигомер за Arg-неговият 32 мутант, е р CAG GAG GAG GGC ATG GGC GCG GTT CAG CCA CTGОН.

Нечувствителният олигомер за His73 заличаването е рGTG GGT GAG CAC GGT GGA GGG GCA GCC -ОН.

Нечувствителният олигомер за Leu 158 вмъкването е рTGT TCG TCC TCA AAG CAG GGC AAT GAT CCC-ОН.

Тези праймери (предшественици) са синтезирани по обичайните методи. За използване в методиката за мутагенеза 10 ртоба от олигомерите или лас праймера 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3' се фосфорилират в продължение на 30 мин при 37°C в 10 μ л от 50 mM трис-HCl (pH 7,5), 0,1 mM ЕДТА 10 mM магнезиев двухлорид, 10 mM дитиосреитол, 0,1 mM АТР, съдържащ 2 U T4 полинуклеотид киназа. За използване като проби (виж по-нагоре) 2 рмола от синтетичните нуклеотиди се фосфорилират както по-горе с изключение на това, че 0,1 mM АТР се замества с 1 μ M

γ -32 АТР (Amersham). Специфичните активности обикновено са по-високи от 5x10⁶ срм/рмола на олигонуклеотидна верига.

Хибридизацията на всеки олигомер и лас праймера към еднонишкова ДНК от фага M13 mp8/TNF, последвана от разширяване на праймера, води до образуване на частично хетеродуплекс ДНК-и, едната нишка на които съдържа мутантната ДНК.

За формиране на частичен хетеродуплекс еднонишкова M13 mp8/TNF ДНК (300 нанограма) се нагрява при температура 80°C (2 мин), при 50°C (5 мин) и при стайна температура (5 мин) в 20 μ л 10 mM трис-HCl (pH 7,5), 0,1 mM ЕДТА, 50 mM натриев хлорид, съдържащ 1 рмол от фосфорилирания олигомер и от праймера (прибавен като аликвотна част при реакцията с киназата). Експресията на праймера започва при прибавяне на 30 μ л 50 mM трис-HCl (pH 8,0), 0,1 mM ЕДТА, 12 mM магнезиев двухлорид, 10 mM дитиосреитол, 0,7 mM АТР, 0,07 mM dАТР, 0,2 mM от всеки dGTP, dTTP, dCTP и съдържащ 2 U E.coli ДНК полимераза I, голям фрагмент и 20 U T4 ДНК лигаза. След 30 минутен престой при стайна температура сместа се инкубира в продължение на 4 ч при 37°C, последвано от инкубиране при 4°C в продължение на една нощ. Аликвотните части се екстрахират с фенол и ДНК се утаява с етанол и се разтваря в 15 μ л вода. ДНК в тези аликвотни части се използва за трансформиране на E.coli JMI03.

лас праймерът хибридизира към фага при място 5' на олигомера. Удължаването на праймера стабилизира хетеродуплексната структура. Олигомерът и праймерът са ензимно фосфорилирани, оставяйки T4 ДНК лигазата да свърже (съедини) свързаните ДНК вериги.

Екстрахираната с фенол хетеродуплексна ДНК от аликвотна проба С (10 μ л) се прибавя към 10 μ л 0,06 M натриев ацетат (pH 4,5), 0,6 M натриев хлорид, 0,6 mM цинков двухлорид и съдържаща 200 U Si нуклеаза. След инкубиране при температура 37°C в продължение на 5 мин се прибавя дрожден екстракт (5 μ г) и нуклеиновите киселини се извличат посредством екстракция с фенол и утаяване с етанол. При използване на същите S1, условия 30 нанограма еднонишкова M13 mp8 ДНК (около 10,000 оформящи плака единици) води до по-малко от 100 плаки в

анализа за ДНК трансформиране, докато същото количество RF ДНК задържа повече от 80% от неговите трансформационни качества. Обработената с S₁ ДНК се използва за трансформиране на *E.coli* JM103 и 5 полученият в резултат фаг се анализира с помощта на скрининг на посевките *in situ*.

Бактериални посеви (15-см в диаметър), съдържащи няколко хиляди рекомбинантни M13 фагови плаки, се пресяват с помощта на 10 плакова хибридизация /98/, за двата генотипа, парентералния и мутантния генотип, при използване на подходящо белязани олигомери върху отделни филтри (около 10⁶ срт на филтър). Хибридизацията се осъществява в 15 продължение на 1 нощ при температура 50°C в 40% формамид, 5 X SSC. Филтрите се промиват при температура 45°C с 2 X SSC. 0,02% натриев додецилсулфат, изсушен на въздуха, и се подлага на X-лъчение при 20 температура -70°C при използване на интензифициращо сито.

Необходимо е да се променя методиката на хибридизация (промяна на концентрацията на SSC) по такъв начин, че да се реши 25 хибридизацията на олигомер към веригата на мутантната ДНК (отлично допълнение) вместо хибридизация към изходната ДНК; всеки мутант ще бъде различен по отношение на неговата способност да хибридира в 30 зависимост от естеството и броя на базите, които са заличени, заместени или вмъкнати. Например откриването на мутации в единствена база изисква твърди условия за различаване между мутантна и немутантна парентерална 35 ДНК, където мутацията е минимална, например заличаване на кодон или заместване на 1-3 бази, хибридизационната проба трябва да бъде по-малка от мутиралия олигомер. Обикновено това е проба с 14 до 20 бази. Задачата на 40 подбиране на мутанти от заличаване се улеснява чрез използването на проба,

съдържаща или състояща се от заличената последователност, при анализ за загуба на последователността. Тази проба не може да се хибридира към ДНК от избраната посевка, с което се потвърждава, че се е появила желаната липса на моделната последователност.

Посевка, която хибридира с белязания олигомер, се отделя и инокулира в *E.coli* JM103. Еднонишковата ДНК /ss/ се получава от супернатантата, а двойнонишковата ДНК се приготвя от клетъчните пелети. ss ДНК се използва като посевка за дидеоксиброене на последователностите на клона, използващи M13 универсален праймер или синтетичен олигомер, с допълнителни последователности, разположени 3' на мутиращата област на тумор некротизисфактор ДНК. Дидеоксиброенето на последователностите потвърждава, че извлечената плака съдържа мутантната ДНК. Такъв фаг се обозначава по следния начин M13 mp8/TNF mtnt.

M13 mp8/TNF mtnt се разцепва с EcoRI и Hind III и се извлича фрагмент, кодиращ тумор некротизисфактор. pTrpXAPTNF се разцепва с EcoRI и Hind III и се извлича векторен фрагмент. След това мутантният фрагмент се лигира към векторния фрагмент и лигиращата смес се използва за трансформиране на *E.coli* W13110, NL 106х или 294/ATCC 31446/. Мутантният тумор некротизисфактор се извлича по метода, описан в примери 18 или 19. Допълнителна информация, отнасяща се до M13 мутагенезата е известна от литературата /99/.

Мутантите, получени в съответствие с този метод, са разделени на три основни класа: замествания, заличавания и вмъквания, и по-нататък се подразделят, както е посочено в таблицата. Ако не е посочено нещо друго, мутантите са получени от зрял тумор некротизисфактор от фиг. 10.

Мутантен тип	TNF място	Представителна модификация при посоченото място
--------------	-----------	--

А. Замествания

I. Модификации в степента или естеството на шаржа

1.	arg 6	his
2.	lys 65	arg
3.	pro 20	arg
4.	asp 10	his
5.	glu 53	thr
6.	gln 47	asp
7.	asp 45	gln или asn
8.	asn 39	asp
9.	asn 34	gln
10.	leu 29	asp
11.	tyr 115	ile
12.	glu 116	lys
13.	pro 117	thr
14.	glu 127	tyr
15.	lys 128	his
16.	ala 134	tyr
17.	glu 135	lys
18.	tyr 141	pro
19.	asp 143	ser
20.	ala 145	thr
21.	glu 146	asn
22.	gln 149	lys
23.	leu 120	lys

II. Модификации в хидрофилния или хидрофобен характер

1.	leu 57	tyr
2.	ser 52	leu
3.	val 41	tyr
4.	gly 108	phe
5.	leu 120	thr
6.	ser 133	gly
7.	ala 134	thr
8.	gly 148	ser
9.	val 16	thr

III. Пространствена модификация (промени в страничната верига)

1.	leu 63	phe
2.	ser 52	tyr
3.	ile 58	leu
4.	gly 40	ile
5.	val 13	phe
6.	leu 120	phe

60250

7.	ile 146	gly
8.	asn 137	glu
9.	ile 154	phe
10.	ile 155	gly
11.	phe 144	ile\

B. Вмъквания

1.	след leu 157	gly gly-COOH
2.	между asp 10 и lys 11	his
3.	между ile 58 и tyr 59	leu
4.	между ser 60 и gln 61	lys
5.	между arg 31 и arg 32	ala
6.	между gly 121 и gly 122	gly
7.	преди val 1	имуногенен полипептид
8.	след leu 157	имуногенен полипептид
9.	между gln 149 и val 150	gly gly
10.	между ala-1 и val 1	
	на preTNF	lys arg

C. Заличаване

1.	gln 149
2.	lys 112
3.	val 1-arg 2
4.	val 1 през pro 8
5.	ala 22
6.	arg 32
7.	glu 53
8.	ala 111 - lys 112
9.	ala 123
10.	ile 154
11.	glu 127

D. Комбинации

1.	ile 58	leu
	leu 57	phe
2.	gln 149	delete
	tyr 151	phe
3.	lys 112	delete
	glu 115	lys
4.	val 1	thr
	ala 22	lys
	gly 24	asn
	ala 33	asp
5.	tyr 115	phe
	glu 116	lys
6.	вмъкнат gly между gly 121 и gly 122	
	след leu 157 добавен gly gly-COOH	
7.	заличен val 1 през gly 66 и заместен	

NH₂-Leu Ala Ile Ile Gly Phe Tyr Val Gln Gly Ser Glu Ala-
Phe Asp Leu Tyr Asp Pro Arg Asn Ile Glu Ala Ser Leu Arg-
Asp Gly Lys Glu Leu Gln Phe Val Gly Gly Leu Tyr Ile Pro-
Glu Tyr Trp Pro Lys Ala Glu Ala Gly Glu Pro Thr-

Мутантен тип	TNF място	Представителна модификация при означеното място
8.	заличен ala 111	
	ala 109	gln
	len 120	his
9.	asn 19	gln
	asn 92	glr
	asn 137	glr

Отбелязани са мутации, при които местата за хидролиза с трипсин при arg 2, arg 6 (примери 20 и 21), arg 32 и arg131 са заличени или променени така, че да не бъдат повече чувствителни спрямо трипсин. Това би могло да увеличи периода на полуразпадане на тумор некрозисфактора *in vivo*, понижавайки способността за ферментативно захващане. Arg 2 и arg 6 местата не са от критично значение, защото биологичната активност се запазва, дори след като споменатите области се отстранят. Обаче разцепването при arg 32 и arg 131 местата води до загуба на активността. Съответно arg 32 и/или arg131 е желателно да бъдат заместени с хистидил или с gln. Това отстраняване или понижаване на чувствителността спрямо ензими на мястото запазва базистността на страничната верига. Освен това и arg 31 се замества с хистидил или с глутамин по същите причини. Места за ензимна хидролиза, също се вмъкват между слепени полипептиди и TNF последователности по такъв начин, че да се създадат места за предварително определено освобождаване на зрял или мутантен тумор некрозисфактор, или такива места се заместват с остатъци във водещата последователност на предтуморен некрозисфактор.

Заместването на asn при asp 45 и експресирането в клетката приемник (например дрождена или клетка на бозайник), способен на гликозилиране, предполага, че ще се продуцира гликозилиран тумор некрозисфактор.

Пример 25. Експресия на тумор некрозисфактор в дрожди при контрол на ADH промотор.

Плазмид TrpXAPTNF се изгражда по описания в пример 17 начин, с изключение на това, че p20KLT или ptrpETA-(или pBR322) се разцепва ензимно с EcoRI и Hind III вместо с XbaI и Hind III и полученият синтетичен фрагмент В има EcoRI съвместими завършеци вместо XbaI съвместими завършеци. След това лигатиращата смес се използва за трансформиране на *E.coli* ATCC 31446 и се изолира плазмид pTNFRI, идентифициран с помощта на рестрикционен анализ, че съдържа тумор некрозисфактор кодираща ДНК, ограничена от EcoRI места. Плазмидът pTNFRI се разцепва ензимно с EcoRI и се извлича фрагмент Т-1, съдържащ тумор некрозисфактор ДНК.

Плазмид pFRPn (EP 60,057A) се разцепва с EcoRI, обработва се с алкална фосфатаза за предотвратяване на повторното циклизиране, присъединява се към Т-1 тумор некрозисфактор фрагмента, при използване на Т4 ДНК лигаза и лигатиращата смес се използва за трансформиране на *E.coli* ATCC 31446. Устойчиви на ампицилин колонии дават две серии плазмид, имащ Т-1 инсерт с противоположна ориентация, както показва рестрикционния анализ върху агароза гелови при електрофореза. Плазмидите се пречистват от *E.coli*; трансформанти и се използват за трансформиране на дрожди, имащи trpI мутация (например дрожди от вида RH218, неограничен ATCC, депозиран под № 44076) към trp⁺ фенотипа. Установено е, че плазмиди, ориентирани така, че стартовият кодон на сегмент Т-1 да е разположен в съседство с алкохолдехидрогеназа промотиращ фрагмент, трансформират дрождите за експресия на тумор некрозисфактор. Тумор некрозисфакторът се извлича от екстрактите на дрождените трансформанти. Устойчивостта на плазмида при ферментация в голям мащаб се подобрява при използване на експресионен плазмид, съдържащ 2 микрона източник на възпроизводимост (реепликация) на мястото на pF RPh хромозомния източник на репликация (arg I) и съвместим вид-приемник /100/.

Пример 26. Експресия на тумор некрозисфактор в клетки на бозайник.

Плазмид рЕНЕР (ЕЗ 117,06А) се разцепва ензимно с EcoRI, обработва се с телешка интерсиална алкална фосфатаза, присъединява се към фрагмент Т-С, получен в пример 25, и лигатиращата смес се използва за трансформиране на E.coli ATCC 31446. Изолят се два плазида (обозначени като рЕНЕРТНФ I и рЕНЕРТНФ II), съдържащи тумор некрозисфактор ДНК в противоположни ориентации, определено с помощта на рестрикционен анализ върху полиакриламидни гелове. Тези плаزمиди се използват за трансфектиране и подбор на CHO DHFR-DUX-BII, CH I и LIK⁻ клетки.

Тъканни културални клетки се трансфектират посредством смесване на 1 μ г рЕНЕРТНФ I или рЕНЕРТНФ II, получени по-горе, с 10 μ г носител ДНК от плъх в обем 250 μ л, 0,25 М калциев двухлорид и последващо прибавяне на капки на 250 μ л HEPES, буфериран разсол (280 mM натриев хлорид 1,5 mM динатриев фосфат, 50 mM HEPES pH 7,1). След престояване в продължение на 30 мин при стайна температура разтворът се прибавя към тъканни културални клетки, нарастващи в 60 мм пластмасови блюда за тъканни култури. Използват се CHO I, CHO DHFR-DUX-BII и LIK⁻ клетки. Блюдата съдържат 3 мл културална среда, подходяща за клетката - приемник.

За CHO и CHO DHFR-DUX-BII клетките, средата е HamF-12среда (Gibco), допълнена с 10% телешки серум, 100 μ г/мл пеницилин, 100 μ г/мл стрептомицин и 2 mM L-глутамин. За LIK⁻ клетъчната линия, средата е Dulbecco, модифицирана със среда на Eagle (DMEM), допълнена, както е посочено по-горе.

След 3-16 часа средата се отстранява и клетките се промиват с 20% глицерин в буфериран с фосфат разсол. Към всяко блюдо се прибавя прясна среда и клетките се инкубират в продължение на повече от 2 дни.

Подборът на трансфектираните клетки приемник се осъществява посредством трипсинизиране клетките след 2 дни нарастване (което включва обработка на клетките със стерилен трипсин 0,5 мг/мл, съдържащ 0,2 мг/мл ЕДТА - етилендиамин тетраоцетна киселина) и прибавяне на 3×10^5 клетки към 10 мм блюда за тъканни култури със селективна

среда. За dhfr⁻ клетки средата е съставена от (F-12 GIBCO) среда с глицин, хипоксантин, amd тимидин (GHT⁻ среда). За DHFR⁺ клетки приемник се прибавя метотрексат (100-1000 нано мола) към нормалната културална среда. Осъществява се контрол при използване на трансфекционни условия в отсъствие на плазмид и с плазмид рFD-II (EP 117,060A), съдържащ нормален DHFR. Колонии, произхождащи от клетки, които се вземат и експресират DHFR плазмид, се наблюдават след 1-2 седмици. Трансформантите се идентифицират по това, че експесират тумор некрозисфактор.

Патентни претенции

1. Метод за получаване на тумор некрозисфактор, характеризиращ се с това, че се получава нуклеинова киселина, кодираща тумор некрозисфактор; конструира се вектор за изразяване на тумор некрозисфактор чрез свързване на нуклеиновата киселина към вектор, съдържащ транскриптивна промоторна последователност и последователности за контролиране на терминацията на транскрипцията и транслацията на нуклеиновата киселина, кодираща тумор некрозисфактор; трансформиране на клетки на гостоприемник с вектора от втория етап; култивиране на клетките на гостоприемника от третия етап; остави се да се натрупа в културата тумор некрозисфактор; като туморният некрозисфактор се извлича от културата.

2. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че тумор некрозисфакторът е човешки тумор некрозисфактор.

3. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че тумор некрозисфакторът е свободен от други цитотоксични протеини.

4. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че тумор некрозисфакторът е свободен от лимфотоксин.

5. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че тумор некрозисфакторът има специфична активност, по-висока от 10 милиона единици/мг протеин.

6. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че тумор некрозисфакторът е предтумор некрозисфактор,

свободен от клетки на бозайници, метионил зрял тумор некрозисфактор, производно на тумор некрозисфактор или блокиран метионил зрял тумор некрозисфактор.

7. Метод съгласно претенция 1, 5
характеризиращ се с това, че мутантният тумор некрозисфактор има един или повече аминокиселинни остатъци на протеина, които са заместени, заличени или вмъкнати, и има следната аминокиселинна последователност: 10

8. Метод съгласно претенция 7, характеризиращ се с това, че протеинът е зрелият протеин.

9. Метод съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че зрелият протеин 15
е заместен, заличен или вмъкнат при единичен аминокиселинен остатък.

10. Метод съгласно претенции 7 и 8, характеризиращ се с това, че зрелият протеин е заместен, заличен или вмъкнат при място, 20
разположено в протеина в аминокиселинните остатъци 35 до 66, 110 до 133 или 150 до 157.

11. Метод съгласно претенции 7 и 8, характеризиращ се с това, че зрелият протеин е заместен, заличен или вмъкнат при място, 25
разположено в протеина в аминокиселинни остатъци 67 до 109.

12. Метод съгласно претенции 7 и 8, характеризиращ се с това, че заместването е с остатък от класа на неутралните, кисели или 30
базични аминокиселинни остатъци на остатък от зрелият протеин, който е различен от класа, към който принадлежат заместените аминокиселини.

13. Метод съгласно претенция 12, 35
характеризиращ се с това, че заместването е от типа, при който остатък, имащ пространствена разклонена верига, замества остатък, лишен от такава странична верига.

14. Метод съгласно претенция 13, 40
характеризиращ се с това, че остатъкът, лишен от пространствена разклонена странична верига, е глицин или серин.

15. Метод съгласно претенция 13, 45
характеризиращ се с това, че остатъкът, лишен от пространствена разклонена странична верига, е фенилаланин или триптофан.

16. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че тумор некрозис факторът се превръща в неразтворим или е 50
белязан посредством ковалентна връзка с група, която може да бъде открита.

17. Метод съгласно претенция 8, характеризиращ се с това, че лизиновият или аргининовият остатък на зрелия протеин от фиг. 10 е заличен или заместен с аминокиселинен остатък, различен от лизин или аргинин.

18. Метод съгласно претенция 7, характеризиращ се с това, че мутантът е цитотоксичен.

19. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че включва култивиране на клетка, трансформирана с ДНК, при което тумор некрозисфакторът се натрупва в културата и продуктът се извлича.

20. Метод съгласно претенция 19, характеризиращ се с това, че ДНК, която кодира тумор некрозисфактор, се третира до заличаване, заместване или вмъкване на предварително определен нуклеотид на мястото на наличния нуклеотид в последователността, съответстваща на ДНК.

21. Метод съгласно претенция 20, характеризиращ се с това, че нуклеотидът е избран така, че да се избегне промяната на аминокиселинната последователност, кодирана от ДНК.

22. Метод съгласно претенция 20, характеризиращ се с това, че третирането включва заместване на фрагмент на ДНК със синтетичен олигодеоксирибонуклеотид.

23. Метод съгласно претенция 20, характеризиращ се с това, че нуклеотидното заместване създава кодон, който има предпочитание към клетка приемник.

24. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че тумор некрозисфакторът е различен от заешки тумор некрозисфактор.

25. Метод съгласно претенция 1, характеризиращ се с това, че мутантният тумор некрозисфактор е различен от човешкия некрозисфактор, при който 5
аминозавършващите остатъци Val I-AUg 2 са заличени.

26. Метод съгласно претенция 25, характеризиращ се с това, че аминокиселинният остатък Arg 32 е заличен.

27. Метод съгласно претенция 25, характеризиращ се с това, че аминокиселинният остатък Arg 32 е заместен с

хистидил.

Приложение: 10 фигури

Литература

1. R. MacFarlan et al., 1980, "AJEBAK" 58 (pt 5) 489-500.
2. D. Mannel et al. 1980 "Infection and Immunology" 30 (2), 523-530.
3. GB 2, 106, 117 A.
4. J. Hammerstrom, 1982, "Scand J. Immunol" 15, 311-318.
5. C. Zacharchuk et al., 1983, "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 80 6341-6345.
6. Ruff et al. 1981, Lymphokines, vol. 2, 235-272; 241-242.
7. S. Green et al., "J. Nat. Cancer Inst. 15 "68 (6) 997-1003.
8. M. Ruff et al. 1980 "J. Immunology" 125 (4), 1671-1677.
9. Искане за Евр. Патент 86475.
10. H. Oettgen et al. 1980, "Recent Results 20 Cancer Res. " 75 207-212.
11. F. Kull et al., 1981, "J. Immunol." 126 (4) 1279-1283.
12. D. Mannel et al. 1980, "Infection and Immunity" 28 (1), 204-211.
13. N. Mathews et al. 1980, "Br. I. Cancer" 42 416-422.
14. S. Green et al. 1976 "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 73 (2) 381-385.
15. N. Satomi et al., 1981, "Jpn J. Exp. 30 Med." 51 (6) 317-322
16. N. Mathews, 1979, "Br. J. Cancer" 40 534-539.
17. K. Haranaka et al. 1981. "Jpn. J. Exp. Med." 51 (3) 191-194.
18. Искане за Евр. патент 90892.
19. T. Umeda et al. 1983 "Cellular and Mol. Biol." 29 (5) 349-352.
20. J. Nissen-Meyer et al. 1982 "Infection and Immunity" 38 (1) 67-73.
21. J. Klostergaard et al. 1981, "Mol. Immunol." 18 (12) 1049-1054.
22. US 4,447,355.
23. Искане за патент (Евр.) 90892.
24. G. Granger et al., 1978 "Cellular 45 Immun." 38 388-402.
25. Искане за Евр. патент 100641.
26. GB 2, 117,385A.
27. US 4,464,465.
28. B. Aggarwal et al. "Thymic Hormones 50 and Lymphokines" 1983.
29. U.S.S.N. 303,687.
- 29a. Bolivar et al. 1977 "Gene" 2 95.
30. Chang et al. 1978 "Nature", 275 615.
31. Goeddel et al. 1979 "Nature" 281 544.
32. Goeddel et al. 1980 "Nucleic Acids Res." 8 4057.
33. EPO No. 36776A.
34. H. De Boer et al. "Proc. Nat'l Acad. Sci." USA 80 21-25 (1983).
35. Siebenlist et al. 1980 "Cell" 20269.
36. Stinchcomb et al. 1979 "Nature" 282 39.
37. Kingsman et al. 1979 "Gene" 7 141.
38. Tschemper et al. 1980 "Gene" 10; 157
39. Jones 1977 "Genetics" 85 12.
40. Hitzeman et al. 1980 "J. Biol. Chem." 255 2073.
41. Hess et al. 1968 "J. Adv. Enzyme Reg." 7 149.
42. Holland et al., 1978 "Biochem." 17 4900.
43. EPO No. 73657A.
44. Tissue Culture, Acad. Press., Kruse and Pattersons 1973.
45. Fiers et al. 1978 "Nature" 273 113.
46. Urlaub 1980 "Proc. Nat. Acad. Sci. USA" 77 4216.
47. J. Richey 1982 October, "Amer. Laboratory"
48. Ugelstad et al. 1983 "Nature" 303 95-96.
49. M. Bradford, 1976 "Anal. Biochem." 72 248-254.
50. U. Sidan et al. 1983, .
51. R. Langer et al. 1981, "J. Biomed. Mater. Res." 15 277.
52. R. Langer et al. 1982, "Chem. Tech." 12-98-195
53. R. Maniatis et al. 1982, Molecular Cloning p.p. 133-134.
54. R. Lawn et al. 1982, "Nucleic Acids Res." 9 6103-6114.
55. D. Goeddel et al. 1980 "Nucleic Acids Res." 8 4057.
56. E. Southern, 1975 "J. Mol. Biol." 98 503-517.
57. T. Maniatis et al. 1978 "Cell" 15 687-701.
58. Mandel et al. 1970 "J. Mol. Biol." 53 154.
59. T. Maniatis et al. 1978 "Cell" 15 146.
60. T. Maniatis et al. 1978 "Cell" 15 90.
61. B. Spofford, 1974 "J. Immun." 112

2111.
 62. E. Carswell et. al. 1975 "Proc. Nat. Acad. Sci." 72 3666-3670.
 63. J. Richey 1982 October, "American Laboratory" 1.
 64. U. Laemmli 1970 "Nature" 227 680-685.
 65. W. Kohr et. al. 1982, Anal. Biochem. 122 348-359.
 66. P. Gray et.al. 1983 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 80 5842-5846.
 67. D. Goeddel et. al. 1980 "Nature (London)" 287 411-416.
 68. Ward et. al. 1972, "I. Virol." 9 61.
 69. H. Aviv et. al. 1972 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 69 1408-1412.
 70. P. Gray et. al. 1982 "Nature" 295 503-508.
 71. M. Wickers et al. 1978 "I. Biol. Chem." 253 2483-2495.
 72. Huynh et al. 1984 Pract, Approaches in Biochem., Oxford, GB.
 73. R. Grantham et al. 1981 "Nucleic Acids Res." 9 43-74.
 74. P. Gray et al. 1982 "Nature" 295.
 75. P. Grea et al. 1980 "Nucleic Acids Res." 8 2331-2348.
 76. Goeddel et al. 1978 "Nature" 281 544.
 77. A. Ullrich et al. 1984, "EMBOI" 3 361-364.
 78. P. Gray et al. 1983 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 80 5842-5846.
 79. S. Anderson et al. 1983 "Proc. Acad. Sci. USA" 80 6836-6842.
 80. M. Jaye et al. 1983 "Nucleic Acids Res." 11 2325-2335.
 81. A. Smith, 1980 "Methods in Enzymology" 65 560-580.
 82. F. Sanger et al. 1977 "Proc Natl. Acad. Sci. USA" 74 5463-5467.
 83. J. Messing et al. 1981 "Nucleic Acids Res." 9 309-321.
 84. EPO No. 36776A.
 85. Gry et al. 1984 "Nature" 312 721-724.
 86. Gry et al. 1984 "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 81 2645-2649.
 87. N. Klecer et al. 1977 "J. Mol. Biol." 116 125.
 88. T. Miller, 1972, Experiments in Mol. Biol. Cold Spring Harbor Lab. p. 304.
 89. S. Naloy et. al. 1981 "I. Bact." 145 1110.
 90. R. Davis et al. 1980 Advanced Bact. Genetics Cold Spring Harbor Lab.
 91. Piken et al. 1983 "Infection and Immunity" 42 269-275.
 92. H. Inouye et al. 1981 "I. Bacteriol." 146 668-675.
 93. D. Leung et. al. 1984 "Biotechnology" 2 458-464.
 94. Wang et. al. Science 228 149-154, 1985.
 95. J. Adelman et al. "DNA" 2 183-193.
 96. J. Messing et al. 1982 "Gene" 19 269-276.
 97. Birnboim and Doly "Nucl. Acid Res." 7 1513-1523.
 98. Benton et al. 1977 "Science" 196 180-182.
 99. GB 2130219A.
 100. J. Beggs 1978 "Nature" 275 104-109.

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

Експерт: Д. Мирчанова

Редактор: Н. Звискова

Пор. 36532

Тираж: 40 СК

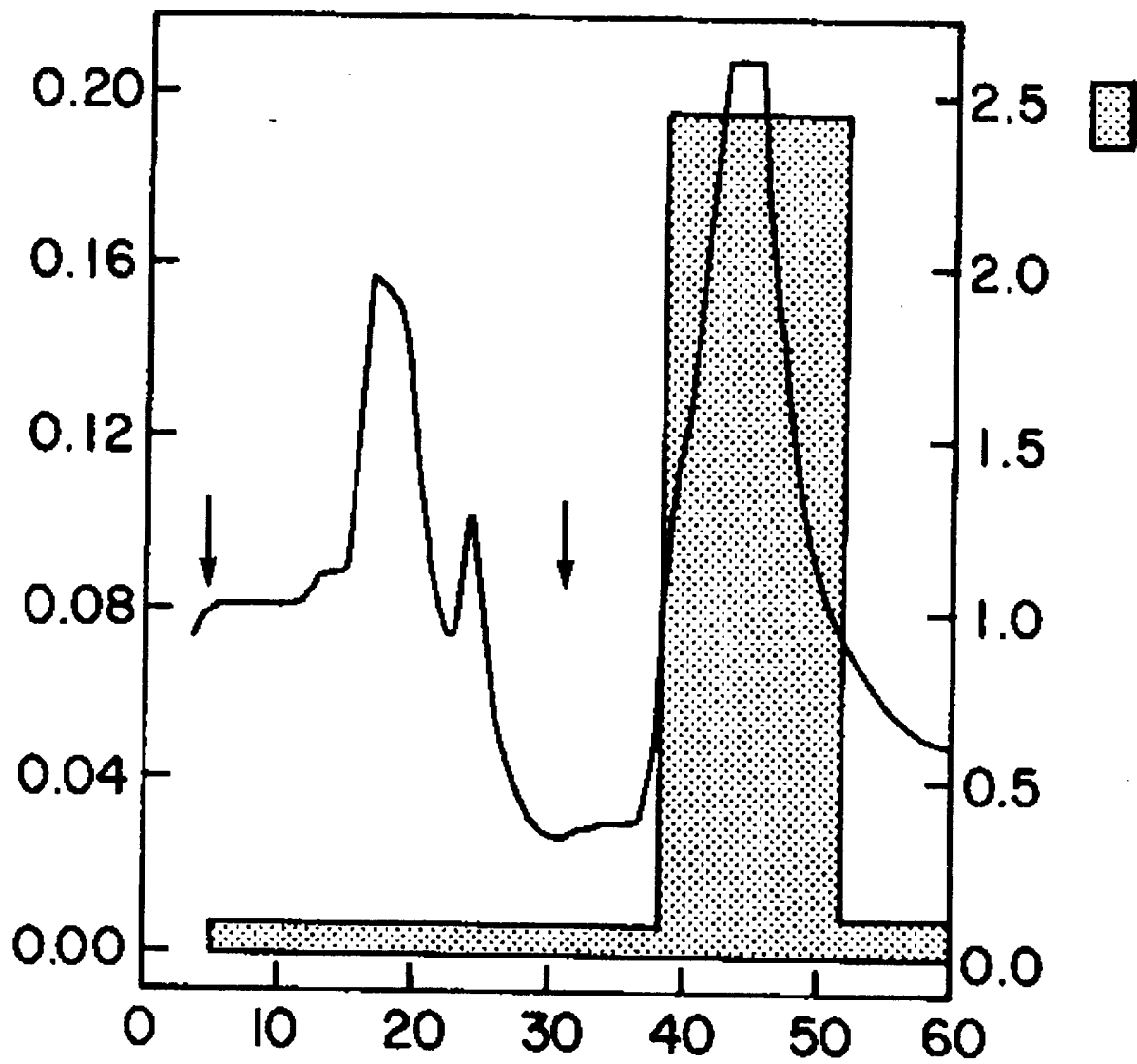
Fig.1.

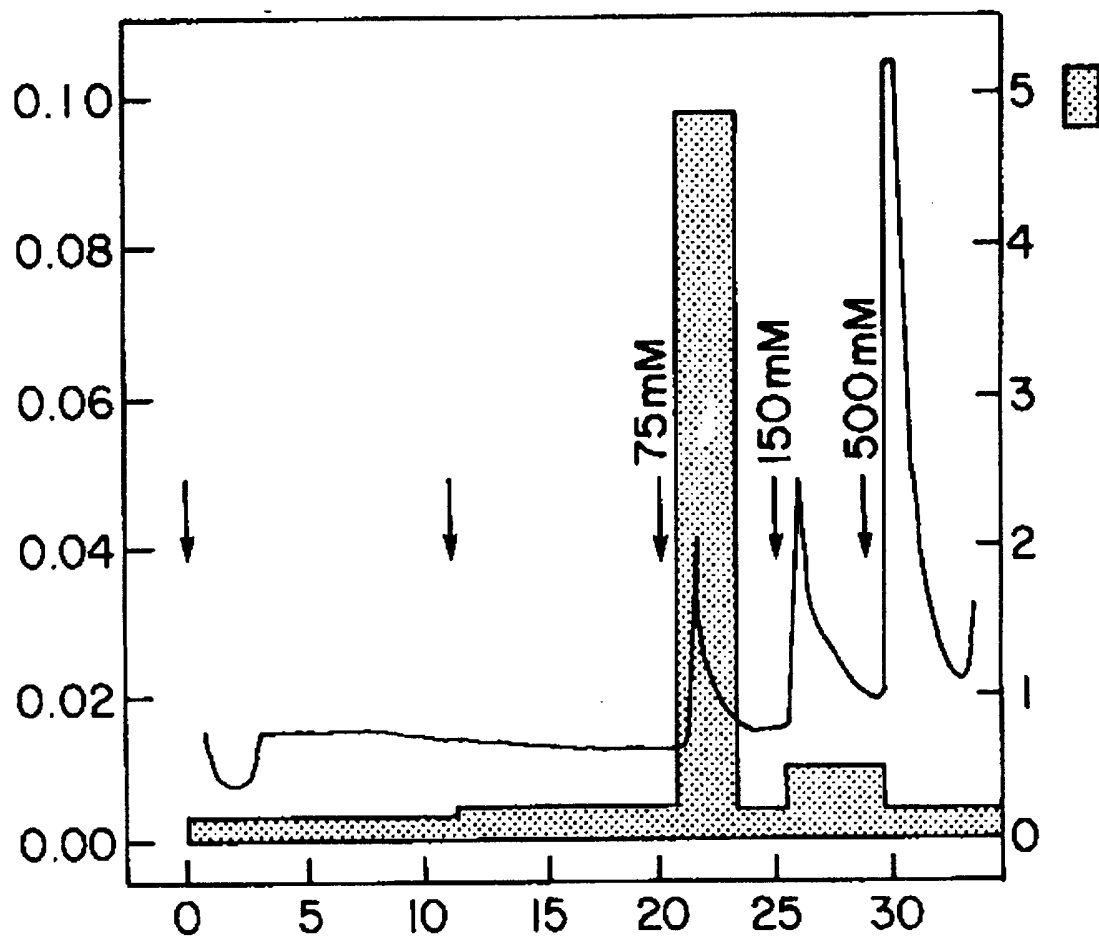
Fig. 2.

Fig. 3.

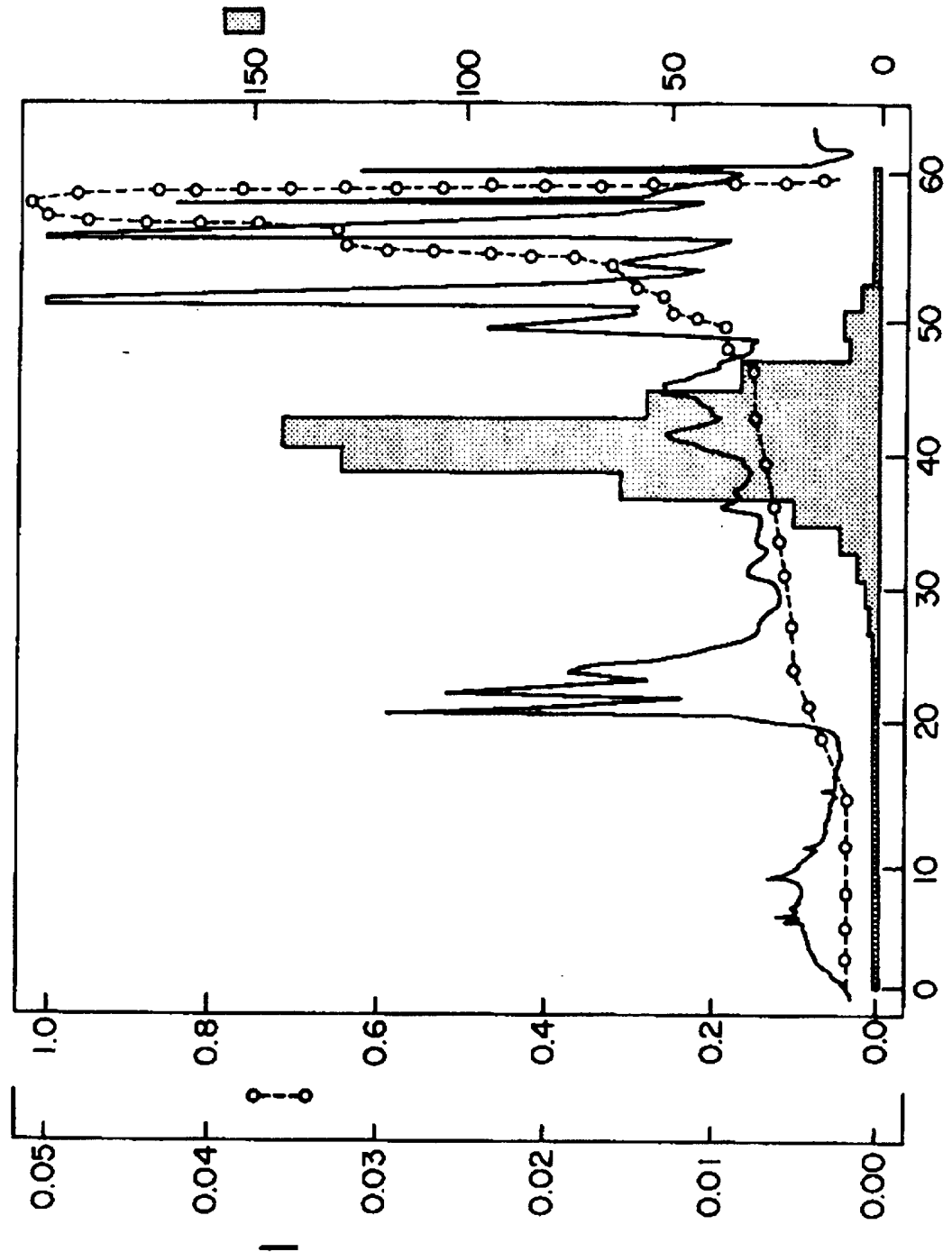


Fig.4.

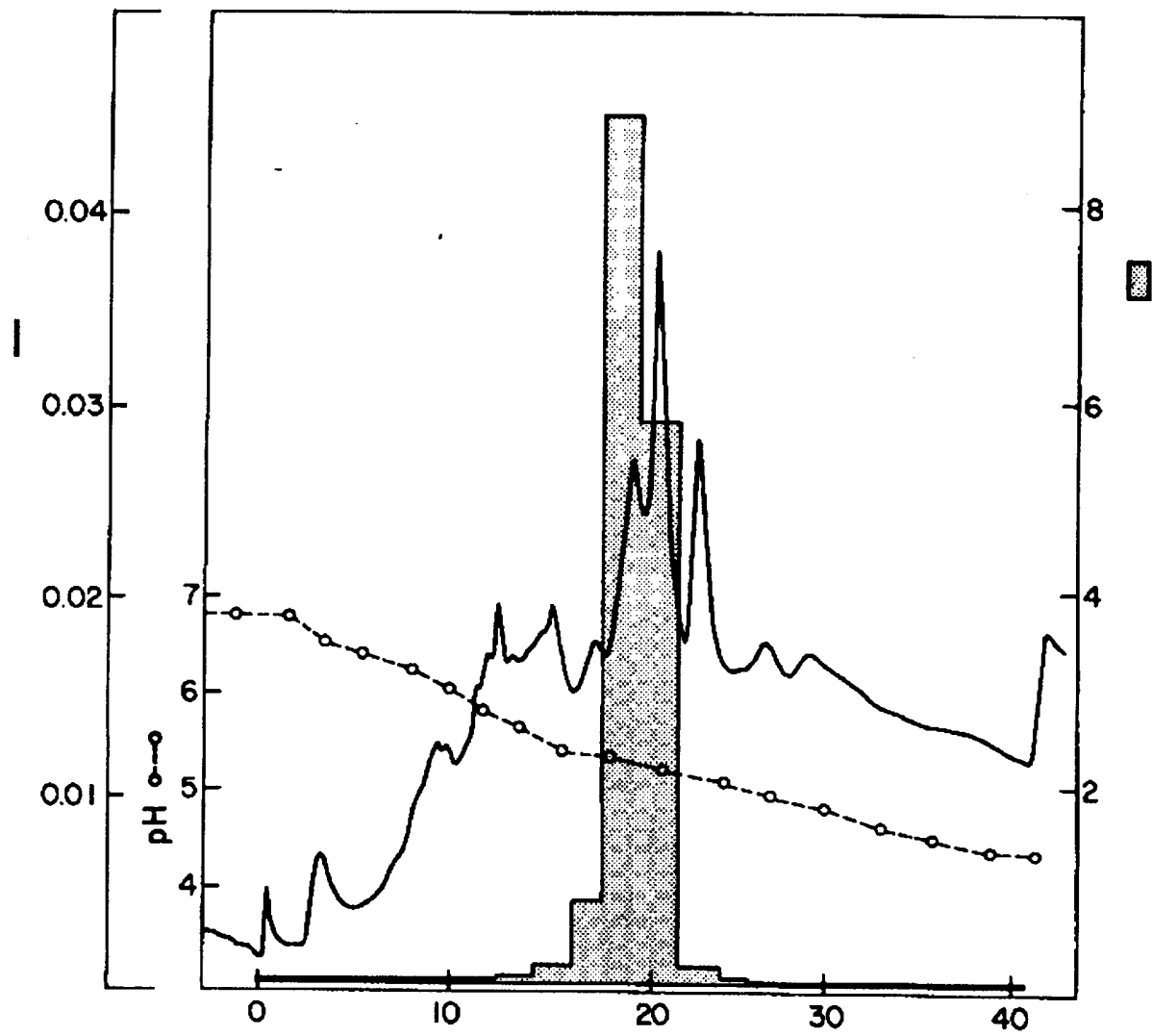


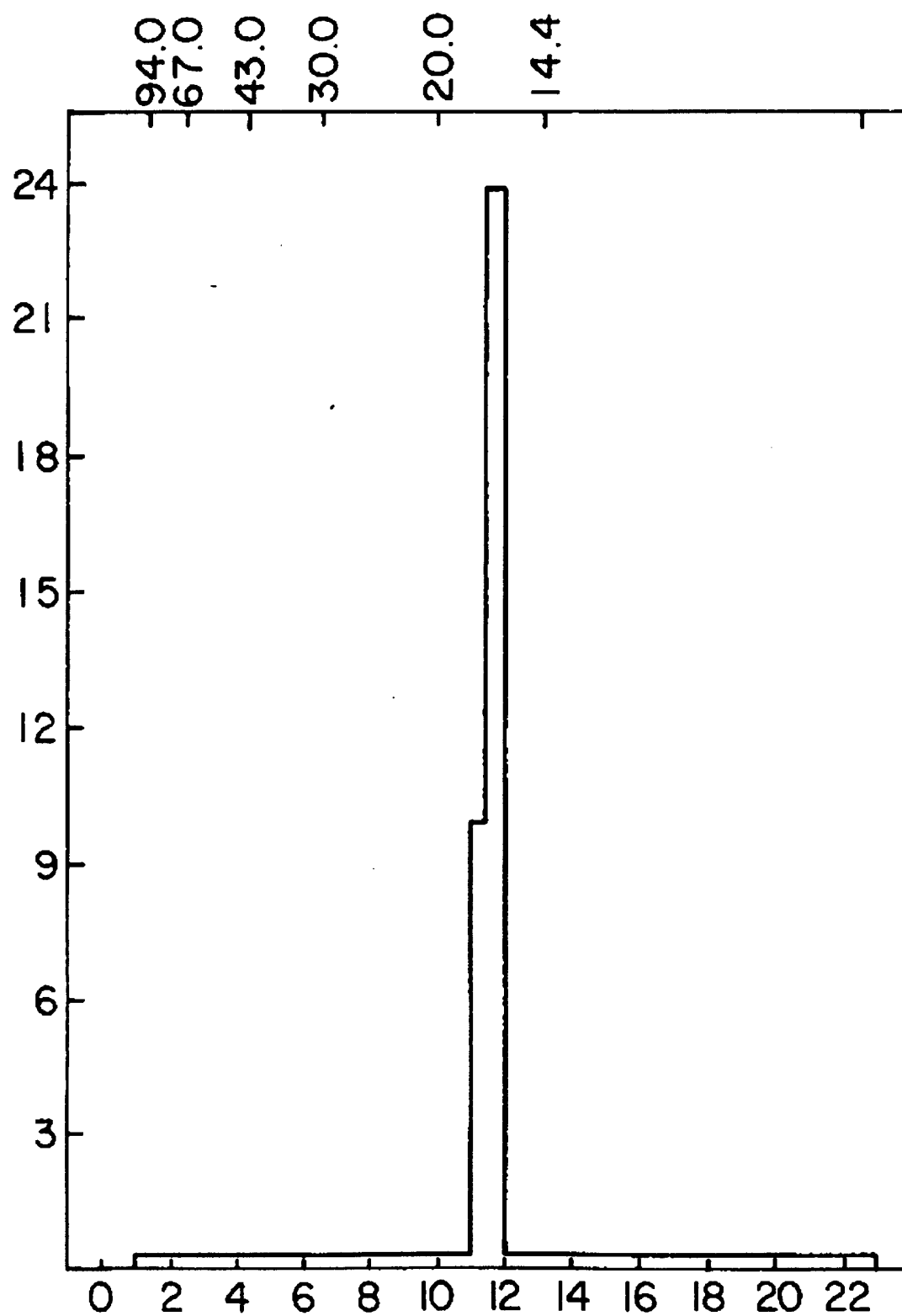
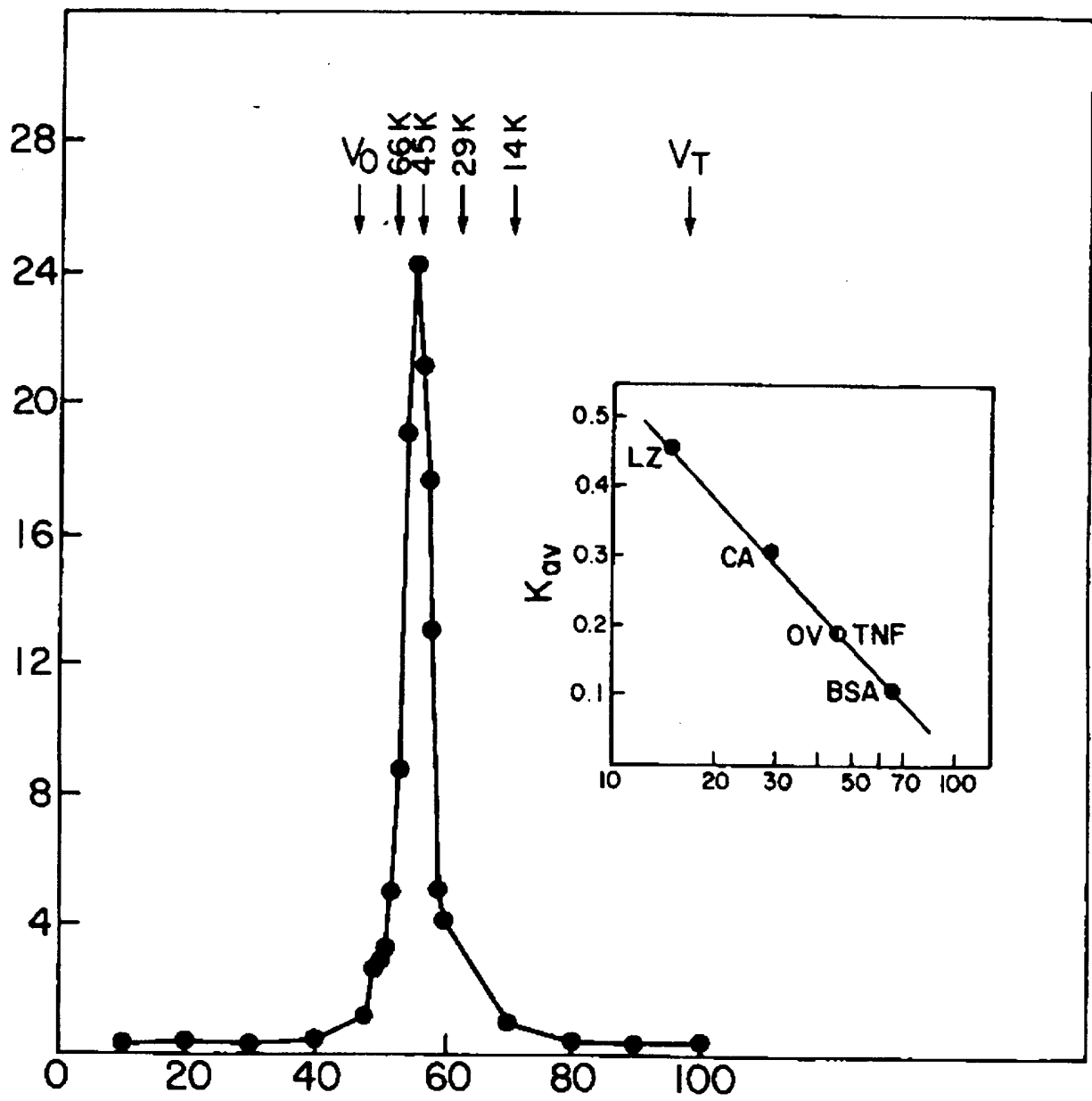
Fig. 5.

Fig. 6.



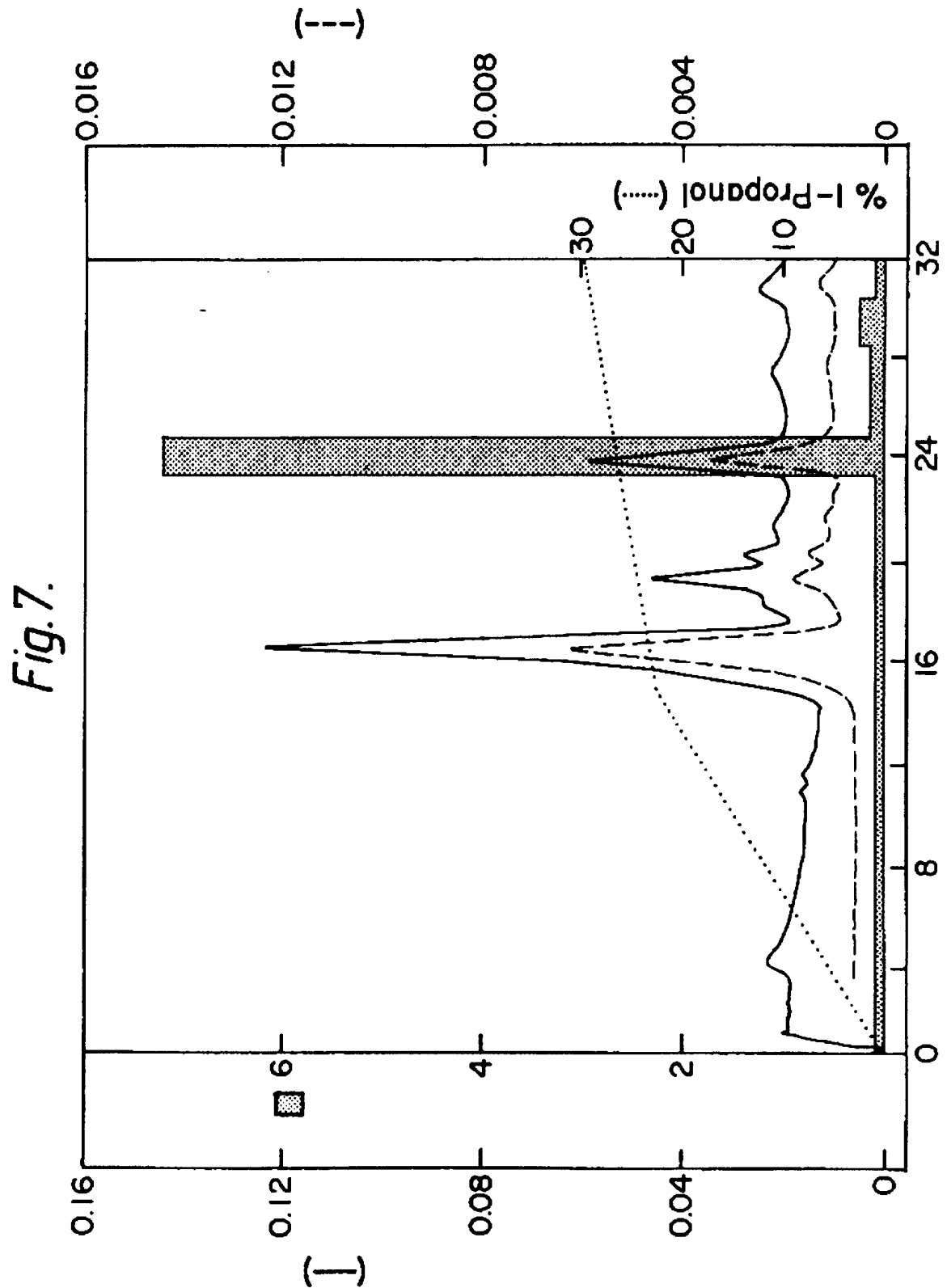


Fig. 8.

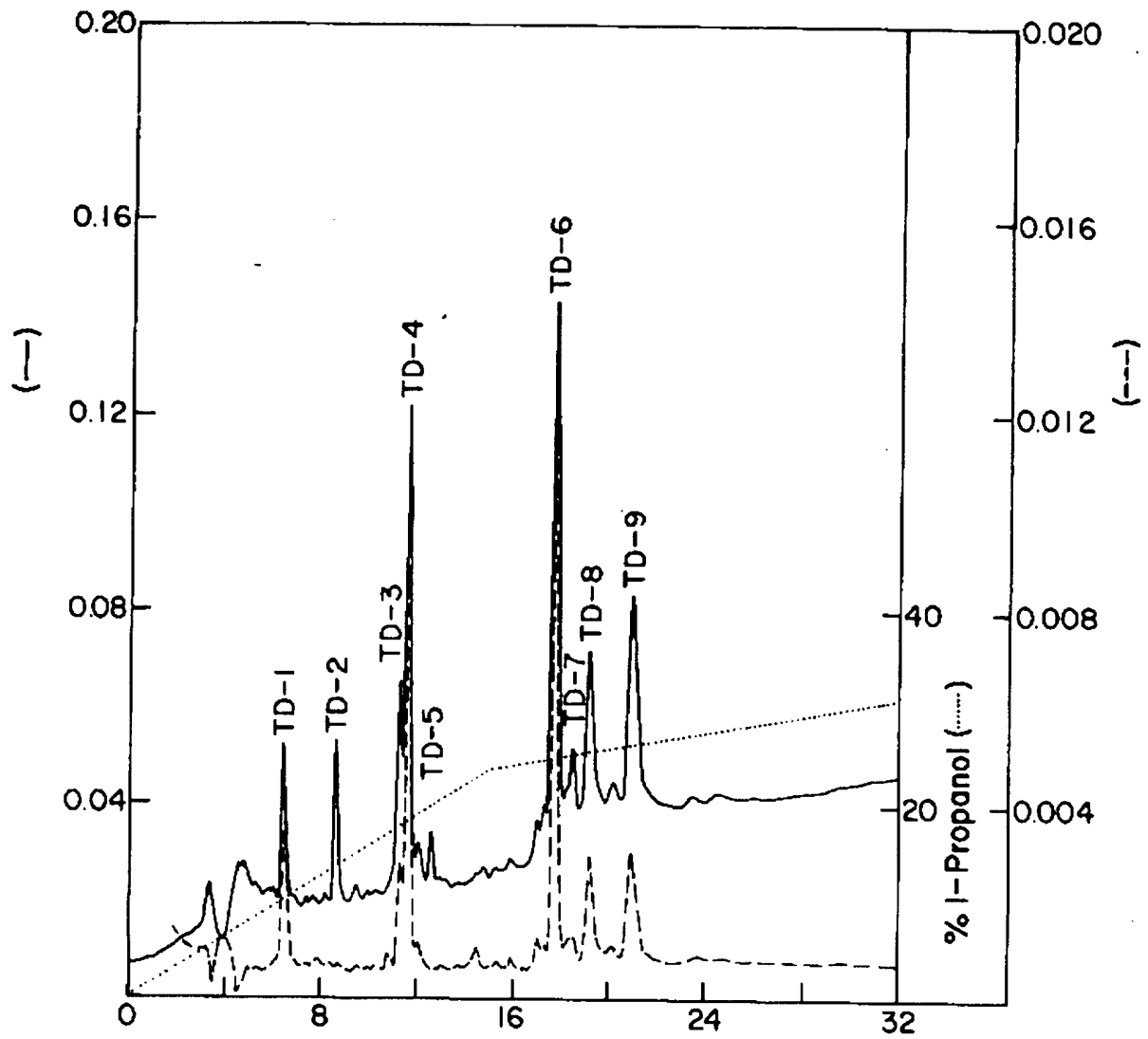


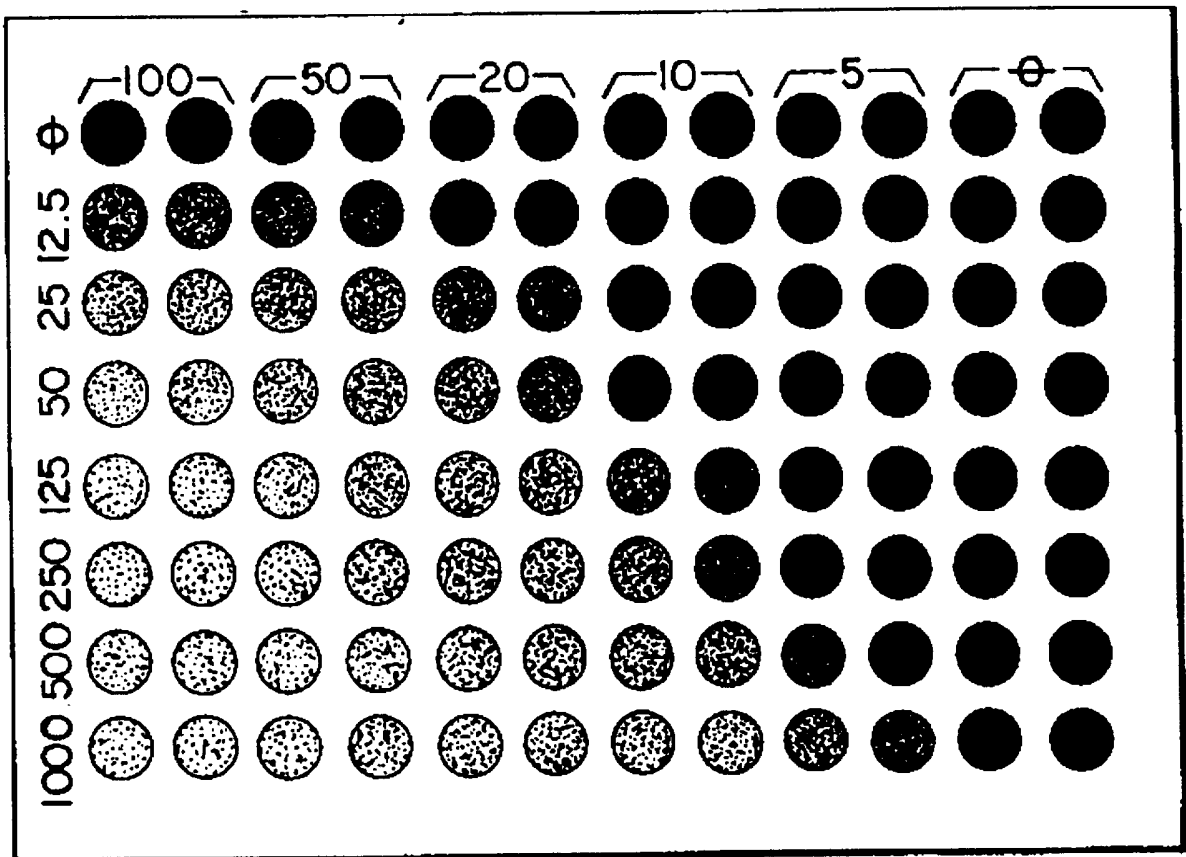
Fig. 9.

Fig.10.

GCAGAGGACCACTAAGA
1
CGGAGAGAACCACTACAGACCCCTCGAAAGAACCCCTCAGACGCCACATCCCTGACAAAGCTGCCAGGACAGCTTCTCTCTCATACTGACCCACGGCTCGAGCCCTCTCTC
50
-76
met ser thr glu ser met ile arg asp val glu leu ala glu ala leu pro lys lys thr gly pro gln
ATG ACC ACT GAA ACC ATG ATC CCG GAC CTG GAG CTG GGC GAG GAG GCG CTC CCC AAG AAG ACA GCG GCG CCC CAG
150
-50
gly ser arg arg cys leu phe leu phe leu phe ser phe leu ile val ala gly ala thr thr leu phe cys leu leu his phe gly val
GCG TCC AGG CCG TUC TTC CTC ACC CTC ACC CTC TTC TCC TCC CTC ATC CTC GCA GGC GGC ACC ACC CTC TTC TGC CTC CAC TTT GCA CTC
250
-20
ile gly pro gln arg glu phe pro arg asp leu phe leu ile ser pro leu ala gln ala val arg ser ser arg thr pro ser
ATC GGC CCC CAG AGG GAA GAG TTC CCC AGG GAC CTC TCT CTA ATC AGC CCT CTG GGC CAG GCA GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT
300
10
Asp Lys Pro Val Ala His Val Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu Gln Trp Leu Asn Arg Arg Ala Asn Ala Leu Leu Ala Asn
GAC AAG CCT GTA GCC CAT GTT GTA GCA AAC CCT CAA GCT GAG GGG CAG CTC CAG TGG CTG AAC CGG GGC AAT GCC CTC CTG GCC AAT
40
Gly Val Glu Leu Arg Asp Asn Gln Leu Val Val Pro Ser Glu Gly Leu Tyr Leu Ile Tyr Ser Gln Val Phe Phe Lys Gly Gln Gly Cys
GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG CTG GTG GTG CCA TCA CAG GGC CTG TAC CTC ATC TCC CAG GTC CTC TTC AAG GGC CAA GGC TGC
50
70
Pro Ser Thr His Val Leu Leu Thr His Thr Ile Ser Arg Ile Ala Val Ser Tyr Gln Thr Lys Val Asn Leu Leu Ser Ala Ile Lys Ser
CCC TCC ACC CAT GTG CTC CTC ACC CAC ACC ATC AGC CGC ATC GCC GTC TCC TAC CAG ACC AAG GTC AAC CTC CTC TCT TCT GCC ATC AAG AGC
90
100
Pro Cys Gln Arg Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro Ile Tyr Leu Gly Gly Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly
CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA GAG GGG GCT GAG GCC AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG AAG GGT
110
130
Asp Arg Leu Ser Ala Glu Ile Asn Arg Pro Asp Tyr Leu Asp Phe Ala Glu Ser Gly Gln Val Tyr Phe Gly Ile Ile Ala Leu OP
GAC CGA CTC AGC GCT GAG ATC AAT CCG CCC GAC TAT CTC GAC TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTG TGA GGA
157
GGACGAACATCCAAACCTTCCCAACGCTCCCTGCCCCCAATCCCTTTATTACCCCTCTTCAGACACCCCTCAACCTCTTCTGGCTCAAAAGAGAAATTGGGGCTTAGGGTCGGAACC
CANECTTAGAACCTTTAAGCAACAGACACCACTTCGAAACCTGGGATTCAGGAATGTGGCTGCACAGTGAATTCGTCGCAACCACTAAGAATTCAACTGGGGCTTCCAGAACTCA
CTGGGGCTTACAGCTTTGATCCTGACATCTGGAATCTGGAACTGAGACACGAGGAGCTTTGGTTCTGGCCAGGAATGCTGCAGGACTTGAGAAGACCTCACCTAGAAATTCACACAAAGTGACCT
TAGGCTTCTCTCTCCAGATGTTCCAGACTTCCTTGAGACACGGAGCCAGCCCTCCCCATGGAGCCAGCTCCCTCTATTATTATGTTGGACTTGTGATTATTATTATTATTATTA
TTTATTTATTACAGATGAATGATTTATTGGAGACCGGGTATCTCTGGGGACCCCAATGAGAGCTGCCCTGGCTCAGACATGTTTTCCGTGAAACCGGAGCTGAACAATAGGCTG
TTCCATGTAGCCCGCTGTGCTCTCTTTTGATTATGTTTTTAAATATTATCTGATTAGTTGTCTAAACAATGCTGATTTGGTGACCAACTGTCCTACTCTGCTGAGCCT
CTGCTCCCCAGGGAGTTGTCTGTATTAATCGCCCTACTATTTCAGTGGCGAGAAATAAAGTTTGCTT

