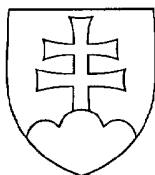


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19)

SK



ÚRAD  
PRIEMYSELNÉHO  
VLASTNÍCTVA  
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

## PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

**279 897**

- (21) Číslo prihlášky: **5067-85**
- (22) Dátum podania: **05.07.85**
- (31) Číslo prioritnej prihlášky: **06/628 059, 06/627 959, 06/628 060, 06/677 454, 06/677 156, 06/677 257**
- (32) Dátum priority: **05.07.84, 05.07.84, 05.07.84, 03.12.84, 03.12.84, 03.12.84**
- (33) Krajina priority: **US, US, US, US, US, US**
- (40) Dátum zverejnenia: **07.05.99**
- (45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: **07.05.99**
- (86) Číslo PCT:

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.<sup>6</sup>

**C 07K 1/22**  
**C 07K 14/525**  
**A 61K 38/19**  
**A 61K 38/21**  
**C 12P 21/02**  
**C 12N 15/28**  
**C 12Q 1/68**

(73) Majiteľ patentu: Genentech, Inc., South San Francisco, CA, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Aggarwal Bharat Bhushan, San Mateo, CA, US;  
Geloddel David Vannorman, Hillsborough, CA, US;  
Lee Sang He, El Granada, CA, US;  
Nedwin Glenn Evan, Guilford, CT, US;

(54) Názov vynálezu: **Spôsob izolácie ľudského nekrotizujúceho faktora (TNF), ľudský TNF, zmes s obsahom TNF, variant TNF, DNA kódujúca TNF, bunka transformovaná s DNA a farmaceutický prostriedok**

(57) Anotácia:  
Spôsob izolácie ľudského nádoru nekrotizujúceho faktora (TNF) z heterogénnej zmesi s obsahom iných proteínov pozostáva z aplikácie kompozície na najmenej jeden silikát, sklo s kontrolovanou veľkosťou pórov, alkyl sefarózu alebo častice živice s vlastnosťou aniónového meniča s jednotnou veľkosťou, na absorpciu ľudského TNF a elúcie adsorbovaného ľudského TNF. Ďalej je opísaná zmes s obsahom ľudského TNF, variant TNF, DNA kódujúca TNF, bunka transformovaná touto DNA a farmaceutický prostriedok na liečenie nádorov, ktorý obsahuje ľudský neglykolyzovaný TNF a ľudský interferón, najmä  $\tau$ -interferón.

## Oblasť techniky

Vynález sa týka spôsobu izolácie ľudského nekrotizujúceho faktora (TNF), ľudského TNF, zmesi s obsahom TNF, variantu TNF, DNA kódujúcej TNF, bunky transformovanej s DNA a farmaceutického prostriedku, ktorý obsahuje ľudský neglykozylovaný TNF a ľudský interferón.

## Doterajší stav techniky

Je známe, že imúnne bunky, ako sú napríklad bunky B, bunky T, zabíjači a makrofágy, vyrábajú látky, ktoré majú cytotoxickú účinnosť na nádorové bunky, ale ktoré sú neškodné pre normálne bunky. Tieto látky sú nazývané rôznymi menami, napríklad lymfotoxín, nádorový nekrotický faktor, makrofágový cytotoxický faktor, hemoragický nekrotický faktor, makrofágový cytotoxín alebo makrofágový cytotoxín, alebo makrofágový cytotoxický faktor. V súčasnosti nie je jasná identita proteínov spojených s týmito názvami. Základné problémy sú v tom, že biologické testy, ktoré sa používajú na detekciu proteínov, medzi nimi nerozlišujú, že sa zdá, že proteíny sa vyskytujú v prírode ako agregáty alebo hydrolytické produkty a že až doposiaľ sa podarilo získať iba také malé množstvá, že ich nebolo možné vyčistiť na vyšší stupeň čistoty, ktorý je potrebný pre úplné charakteristiky týchto proteínov.

Takéto cytotoxické látky sa nachádzajú v sére intaktných zvierat alebo v supernatante kultúry lymfatických buniek, alebo bunkových línií po tom, čo na zvieratá alebo bunky pôsobila látka, o ktorej je známe, že stimuluje proliferáciu imunitných buniek („induktor“). Sérum supernatantu sa izoluje a testuje na cieľových nádorových bunkových líniách na cytotoxickú účinnosť.

Štandardnou bunkovou líniou je L-929, línia myších nádorových buniek. Táto a iné bunkové línie, ktoré sa používajú v biotestoch tohto typu, nie sú vo svojej lytickej odpovedi špecifické, pretože schopnosť lýzie má zrejme mnoho produktov lymfatických buniek. Podobné nešpecifické odpovede boli pozorované v testoch nekrózy nádorov in vitro. Na rozlíšenie rôznych cytotoxických lymfatických produktov nie sú teda postačujúce cytolytické testy, ktoré sú založené na lýzii bunkových línií in vitro alebo na nekróze nádoru in vivo.

Cytotoxické faktory sa predbežne klasifikujú podľa lymfatických buniek, v ktorých sa indukujú. Napríklad lymfotoxín je názov, ktorý sa obyčajne používa pre cytotoxické sekrečné produkty lymfocytov B alebo T, alebo bunkových línií od nich odvodených, zatiaľ čo nádorový nekrotický faktor sa často používa k opisu cytotoxických produktov makrofágov alebo od nich odvodených bunkových línií. Tento klasifikačný systém však nebol vyvinutý do takejto stupňa, v ktorom by neexistovala hocijaká neistota, že sa hovorí o jedinom proteíne, alebo že proteíny, ktoré majú rôzne názvy, sú v skutočnosti rôzne.

Boli robené pokusy vyčistiť a charakterizovať cytotoxické faktory sekretované každým typom buniek. Citácie sa však líšia pokiaľ ide o vlastnosti cytotoxického faktora alebo sa nie celkom zhodujú v uvádzaných vlastnostiach, z čoho vyplýva, že buď bola chybná charakterizácia, alebo že každý typ buniek sekretuje rôzne cytotoxické faktory. Napríklad, cytotoxickým produktom, ktoré sú odvodené od makrofágov, monocytov alebo monocytických bunkových línií a ktorým sa niekedy hovorí nádorový nekrotický faktor (TNF), sa pripisujú vlastnosti, ktoré nezodpovedajú teórii jediného cytotoxického produktu. Pozri napríklad nasledujúcu literatúru: R. MacFarlan a spol.: „AJEBAK“

58(pt5), 489 až 500 (1980), D. Mannela a spol.: *Infection and Immunology* 30(2), 523 až 530 (1980), H. Ohnishi a spol.: GB patent (prihláška) č. 2 106 177A a J. Hammerstrom: *Scand. J. Immunol.* 15, 311 až 318 (1982).

Na druhej strane C. Zacharchuk a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 80, 6341 až 6345 (1983) navrhujú, že lymfotoxín z morčiat a cytotoxický faktor z makrofágov morčiat sú imunochemicky podobné, ako vôbec nie totožné. Podobné závery sú uvádzané i Ruffom a spol.: *Lymphokines* 2, 235 až 272 na str. 241 až 242 (1981).

Pokusy charakterizovať imúnne cytotoxické faktory boli zamerané taktiež na použitie séra alebo peritoneálnej kvapaliny zvierat, ktoré boli vystavené imunogénnym antigénom ako východiskového materiálu. Tieto zdroje obsahujú celú bohatosť stresového imúnneho systému, na rozdiel od produktu z jedného bunkového typu alebo línie. Ako príklady predchádzajúceho sú tu uvedené nasledujúce príklady: S. Green a spol.: *J. Nat. Cancer Inst.* 68(6), 997 až 1003 (1982) (indukčný faktor nekrózy nádoru), M. Ruff a spol.: *J. Immunology* 125(4), 1671 až 1677 (1980) (nádorový nekrotický faktor), H. Enemoto a spol.: Európska patentová prihláška 86 475 (protinádorová látka), H. Oettgen a spol.: *Recent Results Cancer Res.* 75, 207 až 212 (1980) (nádorový nekrotický faktor), F. Kull a spol.: *J. Immunol.* 126 4, 1279 až 1283 (1981) (cytotoxín nádorových buniek), D. Mannel a spol.: *Infection and Immunity* 28(1), 204 až 211 (1980) (cytotoxický faktor), N. Matthews a spol.: *Br. J. Cancer* 42, 416 až 422 (1980) (nádorový nekrotický faktor), S. Green a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 72(2), 381 až 385 (1976) (sérový faktor), N. Satomi a spol.: *Jpn. J. Exp. Med.* 51(6), 317 až 322 (1981), N. Matthews: *Br. J. Cancer* 40, 534 až 539 (1979) (Nádorový nekrotický faktor), K. Haranaka a spol.: *Jpn. J. Exp. Med.* 51(3), 191 až 194 (1981) (nádorový nekrotický faktor), L. Old a spol.: Európska patentová prihláška 90 892, T. Umeda a spol.: *Cellular and Molecular Biology* 29(5), 349 až 352 (1983) a H. Enomoto a spol.: Európska patentová prihláška č. 86 475.

Je možné konzultovať aj ďalšiu literatúru: J. Nissen-Meyer a spol.: *Infection and Immunity* 38(1), 67 až 73 (1982), J. Klostergaard a spol.: *Mol. Immunol.* 18(12), 1049 až 1054 (1981), N. Sloane, US patent 4 359 415, H. Hayashi a spol.: US patent 4 447 355, K. Hanamaka a spol.: Európska patentová prihláška 90 892 (1983) a G. Granger a spol.: *Cellular Immunology* 38, 388 až 402 (1978).

Európska patentová prihláška č. 100 641 opisuje cytotoxický polypeptid, ktorý bol vyčistený tak, že v podstate neobsahuje nečistoty z ľudskej lymfoblastoidnej bunkovej kultúry. Tento polypeptid bol nazvaný lymfotoxín, hoci jeho vzťah k iným v literatúre opísaným cytotoxickým polypeptidom pod názvom lymfotoxín je iba domnienkou. Nie je známe, či tento polypeptid je jediným cytotoxickým polypeptidom, ktorý produkujú imúnne bunky, ako ich navrhoval Zacharchuk a spol. (pozri tamtiež), alebo ak je iba jedným z veľkej rodiny cytotoxických faktorov.

Polypeptid z európskej patentovej prihlášky č. 100 641 má dva aminové konce, väčší variant končí na Leu Pro Gly Val Gly Leu Thr Pro Ser Ala Ala Cln Thr Ala Arg Gln His Pro Lys Met His Leu Ala His Ser Thr..., menší variant skráteným aminovým koncom His Ser Thr Leu Lys Pro Ala Ala.....

Podľa predchádzajúcej literatúry boli interferóny, ktoré majú inhibičnú účinnosť na niektoré nádory, a ktoré sú chabo charakterizovaným proteínom s aminovým koncom Ala-Ala (GB patentová prihláška č. 2 117 385A), kandidáti nelymfotoxinových cytotoxických faktorov. Ako uvidíme, nádorový

nekrotický faktor podľa tohto vynálezu nie je interferón, nie je lymfotoxín a nemá aminový koniec Ala-Ala.

### Podstata vynálezu

Tento vynález sa týka spôsobu izolácie ľudského nádorového nekrotizujúceho faktora (TNF) z heterogénnej zmesi s obsahom iných proteínov, ktorý pozostáva z týchto krokov:

- aplikácia kompozície na najmenej jeden silikát, sklo s kontrolovanou veľkosťou pórov, alkyl sefarózu alebo častice živice s vlastnosťou aniónového meniča s jednotnou veľkosťou, na absorpciu ľudského TNF a
- elúcia adsorbovaného ľudského TNF.

Ľudský TNF je eluovaný etylénglykolom a aniónovou živicom je kvartérna amino-substituovaná polystyrénová aniónová živica.

Predmetom vynálezu je aj ľudský TNF, ktorý

- a) nie je glykolyzovaný,
- b) má molekulovú hmotnosť asi 17 000 stanovenú pomocou SDS-PAGE,
- c) je schopný prednostnej deštrukcie alebo zastavenia rastu nádorových buniek v porovnaní s normálnymi bunkami pri rovnakých podmienkach,
- d) je úplne homogénny podľa stanovenia SDS-PAGE,
- e) obsahuje
  - i) poradie aminokyselín uvedené na obr. 10,
  - ii) poradie zvyškov aminokyselín 35-66 uvedené na obr. 10, alebo
  - iii) poradie zvyškov aminokyselín 110-133 uvedené na obr. 10, alebo
  - iv) poradie aminokyselín Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro,
- f) má špecifickú aktivitu vyššiu ako asi 10 miliónov jednotiek/gram proteínu,
- g) je purifikovaný na stupeň dostatočný na sekvenovanie intaktného TNF alebo na trypsínovú hydrolyzu jeho fragmentu pomocou Edmanovej degradácie v sekvenátore aminokyselín vybavenom studenými zachycovačmi a použitím polybrénového nosiča.

Tento ľudský TNF neobsahuje iné cytotoxické proteíny a neobsahuje proteín patriaci medzi lymfotoxíny,  $\alpha$ -globulíny, serín proteázy a interferón.

Ľudský TNF je v prímеси s fyziologicky prijateľným pufrom, aminokyselinovej alebo neiónovej povrchovo aktívnej látky alebo ich zmesami a je lyofilizovaný.

Predmetom vynálezu je aj zmes s obsahom ľudského TNF, ktorá obsahuje fyziologicky prijateľnú zložku z bunky nie ľudského pôvodu a TNF s poradím aminokyselín uvedených na obr. 10, pričom fyziologicky prijateľnou zložkou je prokaryotický proteín. Táto zmes je tvorená bunkou obsahujúcou heterológny ľudský TNF s poradím aminokyselín uvedených na obr. 10 a bunkou je prokaryotická alebo nižšia eukaryotická bunka.

Ďalším predmetom vynálezu je variant TNF, ktorý je schopný prednostnej deštrukcie alebo zastavenia rastu nádorových buniek v porovnaní s normálnymi bunkami pri rovnakých podmienkach a ktorý obsahuje poradie aminokyselín 1 až 157 uvedených na obr. 10, ale na mieste lokalizovanom v polohe medzi 35 až 66, 110 až 133, alebo 150 až 157 zvyškov aminokyselín najmenej jedna z aminokyselín je substituovaná, vynechaná alebo vložená.

Predmetom vynálezu je aj DNA kódujúca TNF uvedená na obr. 10, ktorá je syntetická, je prítomná v replikovateľnom vektore, pričom vektorom je plazmid alebo vírus.

Ďalším predmetom vynálezu je bunka transformovaná s DNA a farmaceutický prostriedok na liečenie nádorov, kto-

rý obsahuje ľudský neglykolyzovaný TNF a ľudský interferón, najmä  $\tau$ -interferón.

Úlohou tohto vynálezu bolo: a) nezvratne preukázať, či existuje alebo neexistuje iný nádorový nekrotický faktor ako lymfotoxín, a ak áno, potom ho identifikovať takým spôsobom, aby sa dal jasne odlišiť od iných takých faktorov, b) vyrábať takýto faktor inými spôsobmi ako indukovanou pletivovou kultúrou, čo je drahé a získaný produkt je znečistený indukčným činidlom alebo indukciou periférnych krvných lymfocytov, čo je z ekonomického hľadiska nepraktické, zle reprodukovateľné a získava sa produkt znečistený homológny bunkovými alebo plazmovými proteínmi, c) získať DNA kódujúcu takýto nekrotický nádorový faktor a expresovať DNA v rekombinantnej kultúre, d) syntetizovať takýto faktor v rekombinantnej kultúre v maturovanej forme, e) modifikovať kódujúcu sekvenciu alebo štruktúru takéhoto faktora, f) formulovať takýto faktor od terapeutických dávkových foriem a podávať ho zvieratám pri liečení nádorov a g) vyrábať diagnostické činidlá, ktoré sa týkajú takého faktora.

Cytotoxický faktor sa vyčistí do homogenity, charakterizuje sa a expresuje sa v rekombinantnej kultúre. Tento faktor sa kvôli výhodnosti označuje ako nádorový nekrotický faktor (niekedy sa používa skratka TNF od „tumor necrosing factor“). Jeho definícia je uvedená. Z pletivovej kultúry sa získava v podstate v homogénnej forme so špecifickou účinnosťou väčšou ako 10 miliónov jednotiek na mg proteínu, obyčajne asi 100 miliónov jednotiek na jeden miligram proteínu.

Ľudský TNF je charakterizovaný (pokiaľ je syntetizovaný v rekombinantnej kultúre) prítomnosťou neľudských bunkových zložiek, vrátane proteínov, v takom množstve a s takými vlastnosťami, ktoré sú fyziologicky prijateľné na podávanie pacientom. Tieto zložky sú obyčajne kvasinkového, prokaryotického alebo neľudského vyššieho eukaryotického pôvodu a sú prítomné v neškodných množstvách rádovo menších ako asi 1 hmotn. %. Rekombinantná pletivová kultúra umožňuje ďalej výrobu nádorového nekrotického faktora absolútne bez homológnych proteínov. Homológne proteíny sú také proteíny, ktoré sú normálne spojené s nádorovým nekrotickým faktorom ako sa obyčajne vyskytuje v prírode, t. j. v bunkách, vo výlučkoch buniek (bunkové exudáty) alebo v telových kvapalinách. Homológny proteínom ľudského nádorového nekrotického faktora je napríklad ľudský sérumalbumín. Heterológne proteíny sú opačné proteíny, t. j. prirodzene nesprievádzajú ani sa nevyskytujú v kombinácii s príslušným nádorovým nekrotickým faktorom.

Podľa tohto vynálezu sa získava DNA, ktorá kóduje nádorový nekrotický faktor a ktorá, ak je v rekombinantnej alebo transformovanej kultúre dochádza k jej expresii, poskytuje nádorový nekrotický faktor v mnohých kópiách. Táto DNA je nová, pretože cDNA získaná reverznou transkripciou mRNA z indukovaných monocytických bunkových línií neobsahuje žiadny intrón a neobsahuje ani žiadne susediace oblasti kódujúce iné proteíny organizmu, z ktorého mRNA pochádza.

Chromozomálna DNA kódujúca nádorový nekrotický faktor sa získava sondovaním buniek genómových DNA cDNA. Chromozomálna DNA neobsahuje susediace oblasti kódujúce iné proteíny, ale môže obsahovať intróny.

Izolovaná DNA nádorového nekrotického faktora sa ľahko modifikuje substitúciou (nahradením), deléciou (vynechaním) alebo inzerciou (pridaním) nukleotidov. Získajú sa tak nové sekvencie DNA, ktoré kódujú nádorový nekrotický faktor alebo jeho deriváty. Tieto modifikované sekvencie sa používajú na prípravu mutantného nádorového

nekrotického faktora a priamej expresie maturovaného nádorového nekrotického faktora. Modifikované sekvencie sú užitočné taktiež pri zvýšení expresie nádorového nekrotického faktora vo vybraných systémoch hosťiteľ-vektor, príkladom môže byť modifikácia prispôbením sa výhodnému kodónu hosťiteľskej bunky. Tieto nové sekvencie DNA alebo ich fragmenty sa označia a použijú v hybridizačných testoch genetického materiálu kódujúceho nádorový nekrotický faktor.

V procese syntézy nádorového nekrotického faktora sa DNA, ktorá kóduje nádorový nekrotický faktor, liguje s replikovateľným (reprodukovateľným) vektorom. Vektorom sa transformujú hosťiteľské bunky, hosťiteľské bunky sa kultivujú a nádorový nekrotický faktor sa izoluje z kultúry. Tento všeobecný postup sa používa na konštrukciu nádorového nekrotického faktora, ktorý má vlastnosti monocytového nádorového nekrotického faktora alebo na konštrukciu nových derivátov nádorového nekrotického faktora, podľa konštrukcie vektora a podľa hosťiteľskej bunky, ktorá bola vybraná pre transformáciu. Medzi typy nádorového nekrotického faktora, ktoré tu môžu byť syntetizované, patrí maturovaný nádorový nekrotický faktor (s valylovou skupinou na aminovom konci), pre-nádorový nekrotický faktor (niekedy je označovaný taktiež „pre-TNF“) a deriváty nádorového nekrotického faktora zahrnujúce: a) napojené proteíny, v ktorých nádorový nekrotický faktor alebo akýkoľvek jeho fragment (vrátane maturovaného nádorového nekrotického faktora) je naviazaný na iné proteíny alebo polypeptidy peptidovou väzbou na aminovom a/alebo karboxylovom konci aminokyselín nádorového nekrotického faktora alebo jeho fragmentov, b) fragmenty nádorového nekrotického faktora vrátane maturovaného nádorového nekrotického faktora alebo fragmentov pre-nádorového nekrotického faktora, v ktorom akákoľvek proteínová aminokyselina znamená aminokyselínu na aminovom konci fragmentu, c) mutanty nádorového nekrotického faktora alebo jeho fragmentov vrátane maturovaného nádorového nekrotického faktora, v ktorých jedna alebo viacej aminokyselínových skupín je substituovaných, inzerovaných alebo deletovaných a/alebo d) adičné deriváty predchádzajúcich proteínov, fragmentov alebo mutantov s metionylovou alebo modifikovanou metionylovou skupinou (ako je napríklad formylymetionylový alebo iný blokovaný metionylový typ).

Ak je cicavčia bunka transformovaná a) vektorom obsahujúcim úplný štruktúrny gén nádorového nekrotického faktora (vrátane 5 iniciálneho kodónu), alebo b) génom maturovaného nádorového nekrotického faktora alebo derivátu nádorového nekrotického faktora odštiepiteľne ligovaného s eukaryotickým sekrečným signálom (ktorý môže taktiež zahŕňať sekrečný leader presekvencie nádorového nekrotického faktora), potom sa obyčajne bunka kultivuje a maturovaný nádorový nekrotický faktor sa izoluje z kultúry.

Ak DNA, ktorá kóduje nádorový nekrotický faktor, je odštiepiteľne napojená vo vektore k sekrečnému leaderu, ktorý je patrične procesovaný hosťiteľskou bunkou, ktorá má byť transformovaná (obyčajne organizmus, z ktorého sa leader sekvencie získala), hosťiteľ sa transformuje vektorom, kultivuje a nádorový nekrotický faktor sa potom syntetizuje bez metionylvej skupiny alebo blokovanej metionylvej skupiny na aminovom konci. Detailnejšie uvedené - *E. coli* transformovaná vektormi, v ktorých DNA kódujúca maturovaný nádorový nekrotický faktor je ligovaná 5 k DNA kódujúcej signálnej polypeptid STII enterotoxínu, bude príslušným spôsobom procesovať vysoké percento hybridného preproteínu pre maturovaný nádorový nekrotický faktor. Sekrečné leadery a hosťiteľské bunky môžu

byť vybrané tak, že výsledkom je príslušný transport maturovaného proteínu do bunkovej periplazmy.

Do rozsahu tohto vynálezu patria taktiež deriváty nádorového nekrotického faktora iné ako variácie v aminokyselínovej sekvencii alebo glykozylácie. Takéto deriváty sú charakterizované kovalentnou alebo agregáčnou asociáciou s chemickými časticami. Ide obyčajne o deriváty troch tried: soli, kovalentné modifikácie vedľajšie reťazca a kovalentnej skupiny a adsorpčné komplexy.

Ak DNA kódujúca maturovaný nádorový nekrotický faktor je odštiepiteľne ligovaná na vektor, vektor sa použije na transformáciu hosťiteľskej bunky, bunky sa kultivujú a maturovaný nádorový nekrotický faktor sa nachádza v bunkovej cytoplazme. Nie je nutné navrhovať sekrečný systém, ktorý by poskytol maturovaný nádorový nekrotický faktor. To bolo prekvapujúce, pretože priama expresia obyčajne poskytuje metionylovaný proteín. Proteín je stabilný a rozpustný v rekombinantnej pletivovej kultúre, t. j. ani nie je proteolyticky štiepený intracelulárnymi proteázami, ani sa neukladá ako refraktívne telesá. Takto sú získané nové fermentácie, vyznačujúce sa tým, že nižšie eukaryotické alebo prokaryotické bunky majú nemetionylovaný maturovaný nádorový nekrotický faktor umiestnený v cytoplazme.

Aj keď sa nádorový nekrotický faktor môže pripravovať kultiváciou zvieracích bunkových línií, napr. monocytických bunkových línií indukovaných rastom za prítomnosti 12-myristát-13-acetátu 4-bety-forbolu (PMA) alebo nesmrteľných bunkových línií, ako sú napríklad hybridómy alebo transformované bunky EBV (US patent 4 464 465), je výhodné, ak sa nádorový nekrotický faktor syntetizuje v rekombinantnej bunkovej kultúre, ako je opísané.

Po príprave nádorového nekrotického faktora fermentáciou sa nádorový nekrotický faktor vyčistí. Izoluje sa supernatant kultivačnej kvapaliny alebo lyzovanej bunkovej kultúry, pevné častice sa odstraňujú, nádorový nekrotický faktor sa zo supernatantovej zmesi (ktorá obsahuje nádorový nekrotický faktor a ďalšie proteíny) adsorbuje na hydrofóbnej látke, nádorový nekrotický faktor sa z tejto látky eluuje, potom sa nádorový nekrotický faktor adsorbuje na anexe terciárneho amínu, znova sa z toho anexu eluuje, adsorbuje sa na inom anexe (výhodne na kvartérnom aminovom anexe) s prakticky jednotnou veľkosťou častíc a konečne sa nádorový nekrotický faktor zo živice eluuje. Roztok nádorového nekrotického faktora sa prípadne zahusťí a vyčistí chromatofokusáciou v hociakom stupni čistiaceho procesu, napríklad izoelektrickou fokusáciou alebo prejedním sítom gélu, ako je napríklad Sephadex G-25.

Nádorový nekrotický faktor, ktorý je vyčistený od rekombinantnej alebo indukovanej bunkovej kultúry, sa pre terapeutické použitie spojí s fyziologicky neškodnými stabilizátormi a excipientmi, pričom sa pripraví v dávkovej forme, napríklad lyofilizáciou v dávkových fóliách, alebo sa skladuje vo forme stabilizovaných vodných prostriedkov. Pre implantáciu do nádorov alebo miest, z ktorých boli nádory chirurgicky odstránené, sa nádorový nekrotický faktor pripraví na polymérnej matrici. Získa sa tak prostriedok, z ktorého sa nádorový nekrotický faktor pomaly uvoľňuje vo vysokej gradientovej koncentrácii v danom mieste.

Prostriedky podľa tohto vynálezu sa získavajú bez znečistenia inými cytotoxickými faktormi, ako je napríklad lymfotoxín, interferóny alebo iné cytotoxické proteíny citované v literatúre. Terapeutické aplikácie nádorového nekrotického faktora sa však výhodne spájajú s vopred danými množstvami lymfotoxínu a/alebo interferónu. Prostriedky, ktoré obsahujú nádorový nekrotický faktor a interferón, ako je napríklad  $\tau$ -interferón, sú obzvlášť užitočné, pretože majú synergickú cytotoxickú účinnosť. Prostriedky s ná-

dorovým nekrotickým faktorom sa podávajú zvieratám, no najmä pacientom s malígnymi nádormi, v terapeuticky účinných dávkach. Vhodné dávky budú zrejme odborníkom. Vhodné dávky závisia od terapeutických podmienok, ako bude opísané.

Nádorový nekrotický faktor na účely tohto vynálezu je definovaný ako polypeptid iný ako lymfotoxín, ktorý má výhodnú cytotoxickú účinnosť a ktorý má oblasť majúcu funkčnú aminokyselinovú homológiu s aminokyselinovou sekvenciou maturovaného nádorového nekrotického faktora uvedeného na obrázku 10, jeho fragmentu alebo derivátu takéhoto polypeptidu alebo fragmentu. Výhodná cytotoxická účinnosť je tu definovaná ako výhodná deštrukcia alebo inhibícia rastu nádorových buniek v porovnaní s normálnymi bunkami za rovnakých podmienok. Výhodná cytotoxická účinnosť sa stanovuje účinkom polypeptidu na nádorové bunky in vivo alebo in vitro v porovnaní s normálnymi bunkami alebo tkanivami. Pri pokusoch in vitro je diagnostickým znakom účinnosti obvyčajne bunková lýzia, pri pokusoch in vivo nekróza nádorov. Cytotoxická účinnosť sa však môže prejavovať taktiež ako cytostáza alebo ako antiproliferačná účinnosť. Vhodné testovacie systémy sú veľmi dobre známe. Napríklad na stanovenie špecifickej účinnosti nádorového nekrotického faktora sa používa test lýzie buniek, ako opisuje B. Aggarwal a spol. v „Thymic Hormones and Lymphokines“, ed. A. Goldstein, Spring Symposium on Health Sciences, George Washington University Medical Center, 1983. Bunková línia A549, ktorá je v tejto literatúre citovaná, je dostupná z ATCC pod číslom CCL 185. Špecifická účinnosť nádorového nekrotického faktora sa udáva skôr v termínoch lýzie cieľových buniek ako cytostáza. Jedna jednotka nádorového nekrotického faktora je definovaná ako také množstvo nádorového nekrotického faktora, ktoré je potrebné na lýziu 50 % cieľových buniek vysiatych do každej jamky podľa toho, ako je uvedené v príklade 1. To však neznamená, že by tým boli vylúčené iné testy merania špecifickej účinnosti, napr. spôsoby založené na rýchlosti rastu cieľových buniek.

Pre-nádorový nekrotický faktor je jeden z typov nádorového nekrotického faktora, ktorý spadá do predchádzajúcej definície nádorového nekrotického faktora. Pre-TNF je charakterizovaný tým, že v molekule je prítomný signálny (alebo leader)polypeptid, ktorý slúži na posttranslačné nasmerovanie proteínov do miesta dovnútra alebo zvonku bunky. Signálny polypeptid (ktorý nemá nádorovú nekrotickú účinnosť v pravom slova zmysle) sa proteolyticky odštiepi od zvyšného proteínu (s účinnosťou nádorového nekrotického faktora) ako časť sekrečného procesu, v ktorom je proteín transportovaný do periplazmy hostiteľskej bunky alebo kultivačného média. Signálny polypeptid môže byť mikrobiálny alebo cicavčí (vrátane prírodného, presekvencia so 76 skupinami), výhodne je to však signál, ktorý je homológný k hostiteľskej bunke.

Prírodný nádorový nekrotický faktor z normálnych biologických zdrojov má vypočítanú molekulovú hmotnosť asi 17000 podľa elektroforézy s dodcylsulfátom sodným na polyakrylamidovom géle (SDS-PAGE), ako je opísané, izoelektrický bod asi 5,3 a je citlivý na hydrolyzu trypsinom na mnohých miestach. Prírodný nádorový nekrotický faktor, ktorý sa vyčistí HPLC na obrátených fázach, sa hydrolyzuje trypsinom na aspoň deväť fragmentov pri podmienkach opísaných ďalej. Presný počet fragmentov, na ktorý sa nádorový nekrotický faktor trypsinom hydrolyzuje, závisí od takých faktorov, ako je účinnosť trypsinu, od koncentrácie nádorového nekrotického faktora a parametrov inkubácie, vrátane iónovej sily, pH, teploty a času inkubácie.

Nezdá sa, že by nádorový nekrotický faktor bol glykoproteín, pretože sa nezachytáva na afinitnej kolóne s lektinom a analýza odvodennej aminokyselinovej sekvencie neobsahuje žiadne glykolyzačné miesta. A ďalej, materiál, ktorý sa produkuje v kultúre *E. coli* (ktorá nemá schopnosť glykozylácie), sa pohybuje na SDS-PAGE spolu s prírodným nádorovým nekrotickým faktorom.

Stupeň homológie aminokyselinovej sekvencie polypeptidu, ktorý spadá do rozsahu nádorového nekrotického faktora podľa tohto vynálezu, závisí od toho, či homológia medzi týmto proteínom a nádorovým nekrotickým faktorom sa týka týchto oblastí nádorového nekrotického faktora, ktoré sú zodpovedné za cytotoxickú účinnosť. Tie oblasti, ktoré sú rozhodujúce pre cytotoxickú účinnosť, by mali mať vysoký stupeň homológie, aby spadali pod definíciu. Naproti tomu tie sekvencie, ktoré sa netýkajú zachovania konformácie nádorového nekrotického faktora alebo uskutočnenia väzby na receptor, môžu mať relatívne nižšiu homológiu. Kritické oblasti môžu mať cytolytickú účinnosť a stále ešte zostávajú homológne podľa tu uvedenej definície, ak sú skupinami, ktoré obsahujú funkčne podobné aminokyselinové vedľajšie reťazce, substituované. „Funkčne podobné“ sa týka hlavných vlastností vedľajších reťazcov, ako je napríklad alkalita, neutralita alebo kyslosť, alebo prítomnosť, či neprítomnosť stericky objemnej skupiny. Definícia nádorového nekrotického faktora podľa tohto vynálezu špecificky vylučuje z tejto definície lymfotoxín.

Polypeptid, ktorý je definovaný ako nádorový nekrotický faktor, všeobecne bude obsahovať oblasti, ktoré sú v podstate homológne s proteínom na obrázku 10 alebo s jeho fragmentmi v bloku asi od 20 do 100 skupín aminokyselín, zvlášť v blokoch, ktoré sú obklopené zvyškami 36 až 66 a 110 až 133.

Najvýznamnejším faktorom pre zaistenie identity polypeptidu ako nádorového nekrotického faktora je schopnosť antisér v podstate neutralizovať cytolytickú účinnosť maturovaného nádorového nekrotického faktora uvedeného na obrázku 10 a taktiež v podstate neutralizovať cytolytickú účinnosť dotyčného polypeptidu. Je si však treba uvedomiť, že imunologická identita a cytotoxická identita nie sú totožné. Neutralizujúca protilátka nádorového nekrotického faktora z obrázku 10 nemusí viazať príslušný proteín, pretože neutralizujúca protilátka nesmeruje k špecifickému väzobnému miestu na nádorovom nekrotickom faktore, ktoré je rozhodujúce pre jeho cytotoxickú účinnosť. Namiesto toho sa protilátka môže viazať na neškodnú oblasť a mať svoj neutralizujúci účinok sterickou zábranou. Príslušný proteín, ktorý je v tejto neškodnej oblasti mutovaný, nemôže už viazať neutralizujúcu protilátku. Viac-menej takýto proteín by bol nádorovým nekrotickým faktorom v termínoch podstatnej homológie i biologickej účinnosti.

Dôležité je zistenie, že takéto vlastnosti, ako sú napríklad molekulová hmotnosť, izoelektrický bod a podobne, pre natívny alebo divoký typ maturovaného nádorového nekrotického faktora na obrázku 10, ktorý bol získaný z periférnych lymfocytov alebo kultúry bunkových línií, opisujú iba natívne typy nádorového nekrotického faktora. Nádorový nekrotický faktor tak, ako ho uvádza predchádzajúca definícia, zahŕňa tiež iné typy, ktoré nebudú mať všetky vlastnosti natívneho nádorového nekrotického faktora. Nádorový nekrotický faktor podľa definície podľa tohto vynálezu zahŕňa jednako nádorový nekrotický faktor, tak i iné podobné cytotoxické polypeptidy. Napríklad, deriváty nádorového nekrotického faktora, ako sú inzertné mutanty, delečné mutanty alebo opísané napojené proteíny zmenia molekulovú hmotnosť natoľko, že tieto nádorové nekrotické faktory nespádajú pod definíciu natívneho nádorového

nekrotického faktora, pokiaľ ide o jeho molekulovú hmotnosť. Napojené proteíny s maturovaným nádorovým nekrotickým faktorom alebo pre-nádorový nekrotický faktor sám a tiež inzertné mutanty majú väčšiu molekulovú hmotnosť ako natívny maturovaný nádorový nekrotický faktor, zatiaľ čo delečné mutanty natívneho maturovaného nádorového nekrotického faktora budú mať nižšiu molekulovú hmotnosť. Nádorový nekrotický faktor môže byť zastavený taktiež tak, aby znižoval alebo eliminoval citlivosť na hydrolyzu trypsinom alebo inými proteázami. A konečne, post-translačný proces ľudského pre-TNF v bunkových líniách odvodených od neprimárnych cicavcov môže produkovať mikroheterogenitu v oblasti na aminovom konci, takže valín už nebude znamenať aminokyselinu na aminovom konci.

Sekvencia aminokyselín ľudského nádorového nekrotického faktora odvodeného od jeho cDNA je opísaná na obrázku 10. Maturovaný alebo natívny nádorový nekrotický faktor je reprezentovaný aminokyselinovými skupinami 4 až 157. Povoľujeme si, že táto sekvencia obsahuje signálne sekvencie 76 skupín, o ktorých sa predpokladá, že sa odstraňujú počas normálneho procesu translatovaného transkriptu pri produkcii maturovaného proteínu. Šípkami sú označené miesta hydrolyzovateľné trypsinom.

Je potrebné poznamenať, že výraz „spôsobilý“ (schopný) cytotoxickej účinnosti alebo nekrozy nádoru in vivo znamená, že nádorový nekrotický faktor obsahuje polypeptidy, ktoré môžu byť premenené, napríklad enzymatickou hydrolyzou, z neaktívneho stavu analogického zymogénu na polypeptidový fragment, ktorý má žiadanú biologickú účinnosť. Tak inaktívnymi prekurzormi sú spojené proteíny, v ktorých je maturovaný nádorový nekrotický faktor viazaný peptidovou väzbou na karboxylový koniec iného ľudského proteínu alebo jeho fragmentu.

Sekvencia na tejto peptidovej väzbe alebo blízko nej je vybraná tak, aby bola citlivá na proteolytickú hydrolyzu, pri ktorej sa uvoľní nádorový nekrotický faktor buď in vivo, alebo ako časť výroby in vitro. Nádorový nekrotický faktor, ktorý sa takto generuje, potom bude mať definíciu požadovanú cytotoxickú účinnosť.

Aj keď nádorový nekrotický faktor obyčajne znamená ľudský nádorový nekrotický faktor, pod definíciu nádorového nekrotického faktora spadá nádorový nekrotický faktor taktiež z iných zdrojov, ako je napríklad myš, bravčový, konský alebo hovädzi nádorový nekrotický faktor, pokiaľ ale inak zodpovedá štandardom, ktoré sú opísané pre homológne oblasti a pre cytotoxickú účinnosť. Nádorový nekrotický faktor nie je druhovo špecifický. Napríklad ľudský nádorový nekrotický faktor je účinný na nádory myši. Nádorový nekrotický faktor z jedného druhu sa môže taktiež použiť pri terapii iného druhu.

Nádorový nekrotický faktor zahŕňa taktiež multimérické formy. Nádorový nekrotický faktor spontánne agreguje do multimérov, obyčajne do dimérov alebo vyšších multimérov. Multiméry sú cytotoxické a podľa toho sú vhodné na použitie v terapii in vivo. Aj keď je žiaduce, aby sa nádorový nekrotický faktor expresoval a izoloval v podstate ako homogénny multimér alebo monomér, terapeuticky môže byť nádorový nekrotický faktor používaný ako zmes rôznych multimérov.

Pod termínom nádorový nekrotický faktor sú zahrnuté taktiež deriváty nádorového nekrotického faktora. Medzi tieto deriváty patria mutanty aminokyselinovej sekvencie, glykolyzačné varianty a kovalentné alebo agregatívne konjugáty s inými chemickými časťami. Kovalentné deriváty sa pripravujú tak, že sa funkčné skupiny spôsobmi známymi odborníkom naviažu na skupiny, ktoré sa nachádzajú v a-

minokyselinových bočných reťazcoch nádorového nekrotického faktora alebo na N- či C-konci nádorového nekrotického faktora. Medzi tieto deriváty patria napríklad alifatické estery alebo amidy karboxylového konca alebo skupín obsahujúcich karboxylový vedľajší reťazec, napr. asp10, O-acyl-deriváty skupín obsahujúcich hydroxylovú skupinu, ako je napríklad ser52, ser3, ser4 alebo ser5, N-acyl-deriváty skupín s aminovou skupinou na konci, napr. lyzinu alebo arginínu, a deriváty cys101 a cys69. Acylová skupina znamená skupinu, ktorá je vybraná zo skupiny pozostávajúcej z alkylových skupín (normálne alkylové skupiny s tromi až desiatimi atómami uhlíka), ktoré tvoria alkanoylové typy derivátov a karbocyklických alebo heterocyklických skupín, ktoré tvoria aroylové typy derivátov. Reaktívnymi skupinami sú výhodne difunkčné zlúčeniny, ktoré sú známe odborníkom na použitie v skrížene naviazaných proteínoch za vzniku nerozpustnej matrice pomocou reaktívnych vedľajších skupín. Výhodnými miestami pre tvorbu derivátov sú cysteinové a histidínové skupiny.

Kovalentné alebo agregatívne deriváty sú užitočné ako činidlá v imunoteste alebo pri afinitných čistiacich postupoch. Napríklad na použitie v teste alebo pri čistení protilátok nádorového nekrotického faktora alebo bunkových povrchových receptorov sa nádorový nekrotický faktor z roztoku izoluje tak, že sa kovalentne naviaže na Sepharosu aktivovanú bromkyánom spôsobmi dobre známymi, alebo sa adsorbuje na povrchu polyolefinu a to buď skrížene naviazaný s glutaraldehydom, alebo bez neho. Nádorový nekrotický faktor sa taktiež značí detegovateľnou skupinou, napríklad radiojodáciou postupom s chloraminom T, kovalentnou väzbou s chelátmi vzácných zemín alebo konjugáciou s iným fluorescenčným zvyškom vhodným na diagnostické účely, zvlášť na diagnózu hladín nádorového nekrotického faktora v biologických vzorkách pri kompetitívnych typoch imunotestov. Takéto deriváty nemusia spadať pod uvedenú definíciu nádorového nekrotického faktora, pretože nie je nutné, aby mali cytotoxickú účinnosť, ale len skríženú reaktivitu s protinádorovým nekrotickým faktorom.

Medzi mutantné deriváty nádorového nekrotického faktora patria vopred stanovené, t. j. miestne špecifické mutácie nádorového nekrotického faktora alebo jeho fragmentov. Predmetom mutagenézy je skonštruovať takú DNA, ktorá kóduje uvedený nádorový nekrotický faktor, t. j. nádorový nekrotický faktor, ktorý má cytotoxickú účinnosť na nádorové bunky in vitro alebo spôsobuje nekrozu nádorov in vivo a ktorý si zachováva zvyškovú homológiu so sekvenciou na obrázku 10, ale ktorý má taktiež zlepšené vlastnosti a zlepšenú účinnosť. Mutantný nádorový nekrotický faktor je definovaný ako polypeptid, ktorý spadá do homológnej uvedenej definície nádorového nekrotického faktora, ale ktorého sekvencia aminokyselín sa líši od sekvencie nádorového nekrotického faktora deléciou, substitúciou alebo inzerciou. Napríklad lyzinová alebo arginínová skupina nádorového nekrotického faktora (arginín 2, 6, 82, 44 a 131 a lyzín 98, 90 a 65) môže byť mutovaná na histidínovú alebo inú aminokyselinovú skupinu, ktorá nespôsobuje proteolytickú labilitu proteínu. Podobne môže byť cysteín 101 nahradený inými zvyškami a chemicky skrížene naviazaný, čím sa zvýši stabilita proti oxidácii. Nie je nutné, aby mutanty vyhovovali požiadavkám byť účinné ako nádorový nekrotický faktor, pretože i biologicky neaktívne mutanty budú užitočné pri značení alebo mobilizácii ako činidlá v imunotestoch. V tomto prípade si však mutanty zachovávajú aspoň jedno epitopické miesto, ktoré má skríženú reaktivitu s protilátkou nádorového nekrotického faktora. Oblasti skupín 35 až 66 a 110 až 133 nádoro-

vej nekrotickej molekuly majú podstatnú homológiu (50 %) s lymfotoxínom. V podstate sú zachované taktiež hydrofóbne karboxy-konce (zvyšky 150 až 157 nádorového nekrotického faktora) obidvoch molekúl. Pretože obidva proteíny majú cytotoxickú účinnosť alebo nekrozu nádoru in vivo, predpokladá sa, že tieto oblasti sú dôležité v oznamovaní účinnosti lymfotoxínu a nádorového nekrotického faktora. Skupiny v týchto oblastiach sú výhodné pre mutagenézu priamo ovplyvňujúcu účinnosť nádorového nekrotického faktora v bunke. Relatívne nezachovaná oblasť skupín 67 až 109 nádorového nekrotického faktora môže ovplyvňovať presnú polohu dvoch ju obklopujúcich homológnych oblastí v konformácii, ktorá je pre cytotoxickú účinnosť podstatná. Takáto poloha, ktorú je možné v nádorovom nekrotickom faktore dosiahnuť disulfidovou väzbou Cys69-Cys101, môže zodpovedať podobnej oblasti lymfotoxínu a to môže vysvetľovať rozdiely v špecifickosti a účinnosti medzi týmito dvoma molekulami. Tieto zvyšky predstavujú aktívny obal nádorového nekrotického faktora. Môžu byť syntetizované chemicky alebo delečnou mutagenézou, ako je useknutie. Vzniknú tak krátke polypeptidy s účinnosťou nádorového nekrotického faktora.

Aj keď je miesto mutácie vopred stanovené, nie je nutné, aby mutácia sama bola taktiež vopred stanovená. Napríklad pri optimalizácii mutantov v polohe 131 sa vykoná náhodná mutagenéza v kodóne arginínu 131 a expresované mutanty nádorového nekrotického faktora sa testujú na optimálnu kombináciu cytotoxickéj účinnosti a proteázovej rezistencie. Techniky, ktorými sa robia substitučné mutácie na vopred stanovených miestach DNA, ktoré majú známu sekvenciu, sú veľmi dobre známe odborníkom, napríklad mutagenéza primérom M13.

Mutagenéza nádorového nekrotického faktora sa robí tak, že sa vykoná inzercia aminokyselín, obyčajne radu asi od 1 do 10 aminokyselinových skupín, alebo delécia asi od 1 do 30 skupín. Na prípravu konečnej konštrukcie sa môžu medzi sebou kombinovať substitúcie, delécie, inzercie a hocijaké ich subkombinácie. Medzi inzercie patrí napojenie na aminový alebo karboxylový koniec, napr. hydrofóbne rozšírenie karboxylového konca. Výhodne sa však robí iba substitúcia. Mutácia v kódujúcej oblasti nesmie umiestniť sekvenciu mimo čítaciu oblasť. Mutácie taktiež výhodne nevytvárajú oblasti, ktoré by mohli produkovať sekundárne mRNA štruktúry.

Nie všetky mutácie v DNA, ktorá kóduje nádorový nekrotický faktor, budú expresované v konečnom sekretovanom produkte. Napríklad hlavnou triedou substitučných mutácií DNA sú také mutácie, v ktorých rôzny sekrečný leader alebo signál substituujú prirodzený ľudský sekrečný leader a to buď deléciami s leader sekvenciou, alebo substitúciami, v ktorých väčšina alebo všetky prirodzené leadery sú vymenené za leader, ktorý bude pravdepodobne rozpoznávaný zamýšľaným hosťiteľom. Napríklad pri konštrukcii prokaryotického expresného vektora je ľudský sekrečný leader delegovaný v prospech leaderu bakteriálnej alkalickéj fosfatázy alebo tepelne stabilného enterotoxínu II, v prípade kvasiniek je leader substituovaný leaderom kvasinkovej invertázy, alfa faktora alebo kyselinovej fosfatázy. Ľudský sekrečný leader môže byť však rozpoznávaný inými hosťiteľmi ako sú ľudské bunkové línie, najpravdepodobnejšie bunkovou kultúrou vyšších eukaryotických buniek. Ak je sekrečný leader hosťiteľom rozoznávaný, potom napojený proteín obsahuje nádorový nekrotický faktor a leader je obyčajne štiepený na peptidovej väzbe leader-nádorový nekrotický faktor a dochádza k sekrécii nádorového nekrotického faktora. Aj keď je teda na transformáciu hosťiteľa použitá mutácia pre-TNF DNA, mutantný

pre-TNF sa syntetizuje ako medziprodukt a výsledný nádorový nekrotický faktor je obvykle natívny maturovaný nádorový nekrotický faktor.

Inú väčšiu triedu mutantov DNA, ktoré nie sú expresované ako deriváty nádorového nekrotického faktora, sú substitúcie nukleotidov, ktoré zvyšujú expresiu primárne tým, že sú vynechané slučky na aminovom konci transkribovanej mRNA (pozri sprievodnú US patentovú prihlášku 303 687, ktorá je tu zahrnutá ako citácia) alebo sa získajú kodóny, ktoré sú ľahšie transkribované vybraným hosťiteľom, napr. dobre známe *E. coli* preferenčnými kodónmi pre expresiu v *E. coli*.

V podstate homogénny nádorový nekrotický faktor znamená nádorový nekrotický faktor, ktorý v podstate neobsahuje iné proteíny, ktoré sú prirodzené pre zdroj, z ktorého bol nádorový nekrotický faktor izolovaný. To znamená, že nádorový nekrotický faktor (homogénny) v podstate neobsahuje proteíny krvnej plazmy, ako je napríklad albumín, fibrinogén, serínové proteázy,  $\alpha$ -globulíny, cytotoxické polypeptidy, ktoré nie sú nádorovým nekrotickým faktorom, ako je lymfotoxín alebo interferóny, alebo iné proteíny bunky alebo organizmu slúžiaceho ako syntetický pôvodca nádorového nekrotického faktora, vrátane celých buniek a zvyškov buniek. Homogénny nádorový nekrotický faktor môže však obsahovať také látky, ako sú nižšie opísané stabilizátory a excipienty, vopred stanovené množstvá proteínu z bunky alebo organizmu, ktorý slúži ako syntetický pôvodca, proteíny z iných buniek alebo organizmov ako z tých, ktoré sú zdrojom nádorového nekrotického faktora a syntetické polypeptidy, ako je napríklad poly-L-lyzín. Rekombinantný nádorový nekrotický faktor, ktorý sa expresuje v allogénnej, napr. v bakteriálnej, hosťiteľskej bunke, sa ale expresuje bez proteínov zdroja génov.

Nádorový nekrotický faktor sa výhodne syntetizuje v kultúre rekombinantných organizmov. Žiaduce nie sú ani periférne krvné lymfocyty (PBLs), ani bunkové línie. V praxi je ťažko získať PBLs jednej triedy tak, aby neboli znečistené bunkami inej triedy, napríklad je ťažko získať makrofágy bez buniek B alebo T. Pri takomto znečistení sa na produkty týchto buniek budú ťažšie aplikovať separačné postupy, pretože primiešané bunky uvoľňujú ďalšie potenciálne cytotoxické faktory a proteíny. Nádorový nekrotický faktor získaný z nerekombinantnej kultúry je drahý a pozostáva iba z natívneho nádorového nekrotického faktora. Takéto kultúry nemajú flexibilitu rekombinantnej kultúry, ktorou sa vlastnosti nádorového nekrotického faktora zlepšujú.

DNA, ktorá kóduje nádorový nekrotický faktor, sa získava chemickou syntézou, vyhľadávaním a testovaním rezervných transkriptov mRNA z kultúry PBL alebo bunkových línií, alebo vyhľadávaním a testovaním v genómových bankách bunky. Medzi vhodné kultúry bunkových línií patria línie monocytických buniek, ako sú napríklad promyelocytické bunkové línie odborníkmi označené „HL-60“ (jeden typ je dostupný z ATCC ako CCL 240) a histiocytická lymfotická bunková línia U937 (ATCC CRL 1593). Tieto a ďalšie bunkové línie sú indukované tak, aby vystavením buniek chemickým a/alebo fyzikálnym činidlám, došlo k expresii a sekrécii nádorového nekrotického faktora. Nádorový nekrotický faktor môže byť v istých monocytických bunkových líniách efektívne indukovaný iba PMA, iné konvenčné činidlá, ako je napríklad lipopolysacharid, stafylokokový enterotoxín B alebo tymozín  $\alpha$ -1, nebola indukcia nádorového nekrotického faktora v týchto bunkových líniách tak efektívna ako PMA. Pretože je pre lokalizáciu bunkových línií expresujúcich nádorový nekrotický faktor (a teda obsahujúca žiadanú mRNA) požadované rôzne množstvo testovania a vyhľadávania, je efektív-

nejšie jednoducho gén syntetizovať. Syntéza je výhodná, pretože syntézou je možné zaviesť jedinečné reštrikčné miesta (tým sa uľahčí použitie génu vo vektoroch, ktoré obsahujú iné reštrikčné miesta ako sú miesta v natívnej sekvencii) a je možné využiť stupne, v ktorých dôjde k zvýšeniu efektívnosti translácie, ako je diskutované.

Táto DNA je kovalentne označená detegovateľnou látkou, ako je napríklad fluorescenčná skupina, rádioaktívny atóm alebo chemiluminiscenčná skupina známymi spôsobmi. Potom sa použije v konvenčných hybridizačných testoch. Tieto testy sa používajú na identifikáciu vektorov a transformantov nádorového nekrotického faktora, ako je opísané v príkladoch alebo na diagnózu *in vitro*, ako je napríklad detekcia mRNA nádorového nekrotického faktora v krvných bunkách.

mRNA pre nádorový nekrotický faktor je prekvapivo vzácna, dokonca i v indukovaných bunkách HL-60, možná vďaka nestabilite, ktorej príčiny nie sú známe. Ďalej je dôležitý čas, po ktorom sa od indukcie bunky objaví mRNA nádorového nekrotického faktora. mRNA pre nádorový nekrotický faktor sa v bunkách objavuje po veľmi krátkom čase, asi 4 hodiny po indukcii. Tento fakt je odlišný od lymfotoxínu, ktorý sa objavuje asi 12 hodín po indukcii. Tým sa môže stať, že sa cDNA ľahko prehliadne, pokiaľ sa nevie, čo hľadať. Ale ak je raz cDNA kompletne dostupná, ako je to umožnené zisteniami podľa tohto vynálezu, potom už je rutinné vyhľadať cDNA nádorového nekrotického faktora v banke cDNA indukovaných HL-60 alebo PBLs s použitím sond, ktoré majú sekvenciu takejto DNA. Dve banky fágov HL-60 testované na príkladoch obsahujú relatívne stály počet pozitívnych plakov, takže je zrejme, že rutinnými hybridizačnými testami sa indikuje fág, ktorý obsahuje žiadanú cDNA.

Bunky bunkovej línie HL-60, ktoré syntetizujú nádorový nekrotický faktor, sa kultivujú konvenčným spôsobom, pokiaľ nedosiahnu hodnotu asi 8 až 12.10<sup>5</sup> buniek/ml. Bunky sa z kultúry odstránia, premyjú, prenású do bezsérového média a kultivujú v médiu, ktoré obsahuje PMA. V kultivácii sa pokračuje, pokiaľ sa v kultivačnom médiu neakumuluje žiadaná koncentrácia nádorového nekrotického faktora, obvyčajne asi 400 jednotiek nádorového nekrotického faktora v jednom mililitri. Kultivačný supernatant sa výhodne vyčeri centrifugáciou alebo iným spôsobom. Odstránia sa tak zvyšky buniek od rozpustných zložiek. Centrifugácia sa robí iba pri nízkych otáčkach, aby sa pohybovali iba suspendované častice. Ďalej sa supernatant vyčistí opísaným spôsobom.

Alebo sa, a to výhodne, nádorový nekrotický faktor syntetizuje v hostiteľských bunkách, ktoré sú transformované vektormi obsahujúcimi DNA kódujúcou nádorový nekrotický faktor. Vektor je konštrukciou replikovateľnej DNA. Vektory sa tu používajú buď na amplifikáciu DNA, ktorá kóduje nádorový nekrotický faktor a/alebo na expresiu DNA, ktorá kóduje nádorový nekrotický faktor. Expresný vektor je konštrukciou replikovateľnej DNA, v ktorej je sekvencia DNA kódujúca nádorový nekrotický faktor odštiepiteľne napojená na vhodné regulačné sekvencie, ktoré sú schopné uskutočniť expresiu nádorového nekrotického faktora vo vhodnom hostiteľovi. Takými regulačnými sekvenciami sú transkripčný promótor, prípadná operátora sekvencia na reguláciu transkripcie, sekvencie kódujúce vhodné ribozomálne väzbové miesta mRNA a sekvencia, ktorá reguluje termináciu transkripcie a translácie.

Vektorom môže byť plazmid, vírus (vrátane fágov) alebo integrovateľný fragment DNA, t. j. integrovateľný do hostiteľovho genómu rekombinácií. Len čo je raz transformovaný do vhodného hostiteľa, vektor sa replikuje a fun-

guje nezávisle od hostiteľského genómu. V tejto príhláške je pojem „vektor“ genetický k pojmu „plazmid“, ale plazmidy sú v súčasnosti najobvyklejšie používanou formou vektora. Ale aj všetky ďalšie formy vektorov, ktoré majú rovnakú funkciu a ktoré sú alebo budú známe v odbornej literatúre, sú vhodné i pre použitie tu. Vhodné vektory obsahujú replikón a regulačné sekvencie, ktoré sú odvodené od typov zlučiteľných s hostiteľom zamýšľanej expresie. Transformované hostiteľské bunky sú bunky, ktoré sú transformované alebo transfektované vektormi nádorového nekrotického faktora skonštruovanými s použitím techník rekombinantnej DNA. Transformované hostiteľské bunky pravidelne expresujú nádorový nekrotický faktor. Expresovaný nádorový nekrotický faktor sa buď intracelulárne ukladá alebo sa sekretuje buď do periplazmového priestoru alebo do kultivačného supernatantu, čo závisí od vybranej hostiteľskej bunky.

Oblasti DNA sú odštiepiteľne napojené (ak medzi nimi existuje funkčný vzťah) medzi sebou. Napríklad DNA pre-sekvencie alebo sekrečného leadera sú odštiepiteľne napojené na DNA polypeptidov, ak sú expresované ako preproteín, ktorý participuje pri sekrécii polypeptidov, promótor je odštiepiteľne napojený na kódujúcu sekvenciu, ak reguluje transkripciu sekvencie, alebo väzbové miesto ribozómu je odštiepiteľne napojené na kódujúcu sekvenciu, ak je umiestnené tak, že dovoľuje transláciu. Odštiepiteľne naviazaný obvyčajne znamená styčný a v prípade sekrečných leaderov styčný v čítacej forme.

Vhodnými hostiteľskými bunkami sú prokaryoty, kvasinky alebo vyššie eukaryotické bunky. Medzi prokaryoty patria negatívne alebo grampozitívne organizmy, napr. *E. coli* alebo Bacilli. Medzi vyššie eukaryotické bunky patria bunkové línie cicavcov pripravené opísaným spôsobom. Výhodnou hostiteľskou bunkou je kmeň *E. coli* W3110 (ATCC 27 325) rezistentnej na fágy, ktorý je opísaný v príkladoch, aj keď sú vhodné i iné prokaryoty, ako je napríklad *E. coli* B, *E. coli* X1776, (ATCC 31 446), *E. coli* 294 (ATCC 31 537), typy *Pseudomonas* alebo *Serratia Marcesens*.

Výhodný pre expresiu nádorového nekrotického faktora je systém prokaryotický hostiteľ-vektor. Molekula nádorového nekrotického faktora obsahuje dve cysteinové skupiny. Pre post-translačnú tvorbu potenciálnej disulfidovej väzby sú potrebné mierne požiadavky, napríklad *E. coli* expresuje biologicky účinný nádorový nekrotický faktor. K dispozícii je mnoho vhodných mikrobiálnych vektorov. Mikrobiálny vektor obvyčajne obsahuje začiatok replikácie rozpoznávaný zamýšľaným hostiteľom, promótor, ktorý bude fungovať v hostiteľovi, a fenotypický selekčný gén, napríklad gén kódujúci proteíny prepožičiavací antibiotickú rezistenciu alebo dodávajúcu auxotrofnú požiadavku. Pre iných hostiteľov sa zostavujú podobné konštrukcie. *E. coli* sa typicky transformuje plazmidom pBR322, plazmidom odvodenými od typu *E. coli* (Bolivar a spol.: Gene 2, 95 (1977)). Plazmid pBR322 obsahuje gény ampicilínovej a tetracyklínovej rezistencie. Tým sú dostupné ľahké prostriedky pre identifikáciu transformovaných buniek.

Vektory musia obsahovať promótor, ktorý je rozpoznávaný hostiteľským organizmom. Promótor je obvyčajne k zamýšľanému hostiteľovi homológny. Medzi promótor, ktoré sa najčastejšie používajú pri konštrukcii rekombinantnej DNA patrí  $\beta$ -laktamázový (penicilínázový) a laktózový promótorový systém (Chang a spol.: Nature 275, 615 (1978) a Goeddel a spol.: Nature 281, 544 (1979)), tryptofánový (*trp*) promótorový systém (Goeddel a spol.: Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980) a príhlášková publikácia európskeho patentového úradu č. 36 776) a tac promótor (H.



DeBoer a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 21 až 25 (1983)). Aj keď tieto promotory sú najobvyklejšie používanými promotormi, vhodné sú aj iné známe mikrobiálne promotory. Podrobnosti týkajúce sa ich nukleidových sekvencií, ktoré boli publikované, umožňujú zručnému pracovníkovi odštiepiť ich ligovať na DNA kódujúcu nádorový nekrotický faktor v plazmidových vektoroch (Siebenlist a spol.: Cell 20, 269 (1980)) a DNA kódujúce nádorový nekrotický faktor. Dnes je výhodným vektorom derivát pBR322 obsahujúci promotor *E. coli* alkalické fosfatázy a trp Shine-Dalgarno sekvenciu. Promotor a Shine-Dalgarno sekvencie sú odštiepiť napojené na DNA kódujúcu nádorový nekrotický faktor, t. j. sú situované tak, aby podporovali transkripciu mRNA nádorového nekrotického faktora z DNA.

Vedľa prokaryotov sa transformujú vektormi kódujúcimi nádorový nekrotický faktor taktiež eukaryotické mikroby, ako sú napríklad kvasinkové kultúry. *Saccharomyces cerevisiae* alebo občasné pekárské kvasnice, sú najvšeobecnejšie používané nižšie eukaryotické hostiteľské mikroorganizmy, aj keď bežne je dostupných mnoho iných kmeňov. Kvasinkové vektory občasne obsahujú začiatok replikácie z dvojmikrónového kvasinkového plazmidu alebo samostatne sa replikujúcu sekvenciu (ARS), promotor, nádorový nekrotický faktor, sekvenciu pre polyadenyláciu a termináciu transkripcie a selekčný gén; vhodným plazmidom pre expresiu nádorového nekrotického faktora v kvasinkách je plazmid YRp7 (Stinchcomb a spol.: Nature 282 (1979), Kingsman a spol.: Gene 7, 141 (1979) a Tschemper a spol. Gene 10, 157 (1980)). Tento plazmid už obsahuje trp gén, ktorý poskytuje selekčný znak (marker) mutantnému kmeňu kvasiniek, ktorý nemá schopnosť rásť v tryptofáne, napríklad ATCC č. 44 076 alebo PEP4-1 (Jones: Genetics 85, 12 (1977)). Prítomnosť oblasti trp v genóme kvasinkovej hostiteľskej bunky tak poskytuje účinné okolie na detekciu transformácie rastom za neprítomnosti tryptofánu.

Medzi vhodné promotórové sekvencie v kvasinkových vektoroch patria promotory pre metalotionein, 3-fosfoglycerátkinázu (Hitzeman a spol.: J. Biol. Chem. 255, 073 (1980)) alebo iné glykolytické enzýmy (Hess a spol.: J. Adv. Enzyme Reg. 7, 149 (1968) a Holland a spol.: Biochemistry 17, 4900 (1978)), ako sú napríklad enoláza, glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza, hexokináza, pyruvát-dekarboxyláza, fosfofruktokináza, glukózo-6-fosfát-izomeráza, fosfoglukózo-izomeráza a glukokináza. Vhodné vektory a vhodné promotory na použitie pri expresii kvasinkami sú ďalej opísané R. Hitzemanom a spol.: Publikácia európskeho patentového úradu č. 73 657. Inými promotormi, ktoré majú ďalšiu výhodu transkripcie regulovanej podmienkami rastu, sú promotor oblasti alkoholdehydrogenázy 2, izocytochróm C, kyselínová fosfatáza, degradatívne enzýmy spojené s metabolizmom dusíka, uvedené metalotionein a glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenázy a taktiež enzýmy, ktoré sú zodpovedné za využitie maltózy a galaktózy. Pri konštrukcii vhodných expresných plazmidov sa terminačné sekvencie spojené s týmito génmi taktiež ligujú do expresného vektora 3 sekvenciou kódujúcou nádorový nekrotický faktor. Tým sa zaisťujú polyadenylácia mRNA a terminácia.

Okrem mikroorganizmov môžu byť ako hostiteľské bunky použité taktiež kultúry buniek, ktoré sú odvodené od mnohobunkových mikroorganizmov. Tie však nie sú výhodné, pretože až doposiaľ boli s mikróbmí, ktoré expresujú nádorový nekrotický faktor, získané vynikajúce výsledky. V princípe je možné pracovať s hociktorou kultúrou vyšších eukaryotických buniek, či už kultúrou zo stavov-

cov, alebo nie. Najväčší záujem sa sústreďuje na bunky stavovcov. V posledných rokoch sa množenie buniek stavovcov v kultúre (pletivová kultúra) stalo rutinnou záležitosťou (Tissue Culture, Academic Press, ed. Kruse a Patterson, 1973). Príkladmi užitočných hostiteľských bunkových línií sú bunky VERO a HeLa, bunkové línie vaječníc čínskeho škrečka (CHO) a bunkové línie WI38, BHK, COS-7 a MDCK. Expresné vektory pre tieto bunky obsahujú občasne (ak je to nutné) začiatok replikácie, promotor, ktorý je umiestnený proti smeru génu, ktorý má byť expresovaný, spolu s ribozómovým väzbovým miestom, miesto strihu RNA, ak sa používa intrón obsahujúci genómovú DNA, polyadenylačné miesto a sekvenciu terminácie transkripcie.

Regulačné sekvencie transkripcie a translácie v expresných vektoroch, ktoré sú určené na použitie pri transformácii buniek stavovcov, sa často získavajú z vírusových zdrojov. Tak napríklad občasne používané promotory sú odvodené od Polyoma Adenovirus 2 a najvýhodnejšie od typu Simian Virus 40, t. j. SV40. Tieto skoré a neskoré promotory sú zvlášť užitočné, pretože sa ľahko získavajú z vírusu ako fragment, ktorý obsahuje taktiež SV40 vírusový začiatok replikácie (Fiers a spol.: Nature 273, 113 (1978)). Je možné používať taktiež väčšie alebo menšie SV40 fragmenty za predpokladu, že obsahujú sekvenciu s približne 250 párami nukleotidov od Hind III miesta k Bgl I miestu umiestnenú vo vírusovom začiatku replikácie. Ďalej je taktiež možné, a často je to aj žiaduce, využiť ľudský genómový promotor, riadiace a/alebo signálne sekvencie občasne spojené s nádorovým nekrotickým faktorom za predpokladu, že takéto riadiace sekvencie sú zlučiteľné so systémami hostiteľských buniek.

Začiatok replikácie sa môže získať buď konštrukciou vektora, ktorý by zahŕňal exogénny začiatok, ako napríklad taký, ktorý je možné odvodiť od SV40 alebo od iných vírusových zdrojov (napríklad Polyoma, Adenovirus, VSV alebo BPV), alebo sa môže získať chromozómalným replikačným mechanizmom hostiteľskej bunky. Ak je vektor integrovaný v chromozóme hostiteľskej bunky, potom je často druhá možnosť postačujúca.

Pri výbere vhodnej hostiteľskej cicavčej bunky na transfekciu vektorov, ktoré obsahujú DNA sekvencie kódujúce tal nádorový nekrotický faktor ako dihydrofolát-reduktázu (DHFR), je vhodné vybrať hostiteľa podľa toho, aký typ DHFR proteínu sa použije. Ak sa používa DHFR proteín divokého typu, potom je výhodné vybrať takú hostiteľskú bunku, ktorá je deficitná na DHFR. To umožní použiť DHFR kódujúce sekvencie ako markérov pre úspešnú transfekciu do selektívneho média s nedostatkom pyrimidínu, glycinu a tymidínu. V tomto prípade je patričnou hostiteľskou bunkou bunková línia vaječníc čínskeho škrečka (CHO) deficitná na DHFR aktivitu, ktorá sa pripraví a namnoží spôsobom opísaným Urlaubom a Chasinom: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216 (1980).

Naopak, ak sa ako riadiaca sekvencia použije DNA kódujúca DHFR proteín s nízkou väzbovou afinitou k metotrexátu (MTX), potom nie je nutné používať bunky rezistentné na DHFR. Pretože mutantná DHFR je rezistentná na MTX, je možné použiť médium obsahujúce MTX ako prostriedok selekcie za predpokladu, že hostiteľské bunky samy sú na MTX citlivé. Väčšina eukaryotických buniek, ktoré sú schopné absorbovať MTX, je citlivá na metotrexát. Jednou z týchto užitočných bunkových línií je línia CHO, CHO-K1 (ATCC č. CCL 61).

Nádorový nekrotický faktor sa najskôr izoluje z kultúry. Transformované nesekretujúce bunky sa lyzujú sonikáciou alebo iným prijateľným spôsobom. Zvyšky buniek sa odstránia odstredovaním. Supernatanty zo sekretujúcich buniek (a-

ko sú napríklad indukované bunkové línie) sa od buniek oddeľia odstredňovaním. Potom sa použije jeden alebo viac z nasledujúcich stupňov a/alebo sa použijú úplne iné spôsoby. Podľa nasledujúceho spôsobu sa nádorový nekrotický faktor vyčistí do takého stupňa, ktorý je postačujúci pre sekvenovanie. Tento stupeň však nie je nutné vyčistiť do takého stupňa, aký je požadovaný pre terapeutický produkt.

V prvom čistiacom stupni sa nádorový nekrotický faktor z lyzovanej kultúry alebo supernatantu kultivačného média adsorbuje na hydrofóbnu látku. Ako hydrofóbná látka sa výhodne používa neželatínový hydrofóbný povrch, ako je napríklad kremičitan alebo polyolefin, hoci je vhodná taktiež alkyl-Sepharosa. Výhodným usporiadaním je sklo s regulovanou veľkosťou pórov. Pripraví sa zmes asi jedného objemu skla s regulovanou veľkosťou pórov s 50 objemami supernatantu. Pri asi 4 °C sa za trepania nechá uskutočňovať adsorpcia asi 30 minút až asi 2 hodiny, výhodne počas asi jednej hodiny, za mierne alkalických podmienok. Adsorbent by sa mal potom premyť vhodným pufrum, aby sa odstránili zachytené primiešané proteíny.

Adsorbovaný nádorový nekrotický faktor sa z hydrofóbnnej látky eluuje zmenou solvatačných vlastností média. Elúcia sa môže robiť tak, že sa nechá prechádzať roztok pufovaný na pH asi 7 až 8,5, výhodne na pH asi 8, obsahujúci IM soľ a efektívne množstvo vodného roztoku s vodou miešateľného organického polyolu, ako je napríklad etylénglykol alebo glycerín, obyčajne etylénglykol v rozmedzí 10 až 30 objemových percent, výhodne asi 20 objemových percent. Optimálne podmienky ale závisia od použitého polyolu. Frakcie, ktoré obsahujú nádorový nekrotický faktor, sa detekujú testom *in vitro*, ako je opísané, alebo

iným vhodným testom. Čistenie a výťažok tohto stupňa z monocytickej bunkovej kultúry, rovnako ako nasledujúce stupne, sú uvedené v tabuľke I.

Ďalšie čistenie sa robí tak, že sa nádorový nekrotický faktor adsorbuje na anexe terciárneho alebo kvartérneho aminu. Výhodnými živcami na tento účel sú hydrofilné matrice, ako je napríklad skrižene naviazaný polystyrén, dextrán alebo celulóza, substituované alkylovými terciárnymi alebo kvartérnymi aminovými skupinami. Komerčné produkty tohto typu sú dostupné ako DEAE celulóza, QAE Sephadex alebo pod obchodným označením Mono Q (vo všetkých týchto prípadoch alkylový substituent znamená etylovú skupinu). Najlepšie výsledky boli dosiahnuté s rýchlou proteínovou kvapalinovou chromatografiou systémom, ktorý opisuje J. Richey v „American Laboratory“, október 1982, s použitím makroporéznych v podstate jednotných častíc podľa Ugelstadta a spol.: *Nature* 303, 95 až 96 (1983). Týmto spôsobom je možné vyčistiť nádorový nekrotický faktor na vysoký stupeň čistoty.

Vyčistenie do v podstate homogenity je možné dosiahnuť len ďalším delením SDS PAG elektroforézou alebo vysokotlakovou kvapalinovou chromatografiou na obrátených fázach na C4 (HPLC), ako je ďalej opísané v príkladoch. Tento produkt však nie je žiaduci pre terapiu, pretože stratil podstatnú časť účinnosti vystavením účinku SDA alebo organickým rozpúšťadlám pri HPLC. Koncentrácia proteínu sa stanoví podľa M. Bradforda. *Anal. Biochem.* 72, 248 až 254 (1976). Počas posledných stupňov čistenia bola koncentrácia proteínu stanovovaná pomocou zloženia aminokyselín a tiež sekvenovaním aminokyselín.

Tabuľka I

Čistenie ľudského nádorového nekrotického faktora z kultivačného média buniek HL 60

čistiaci stupeň	konečný objem (ml)	celkový proteín (mg)	cytolytická aktivita (jednotky)	relatívna špecifická aktivita (jedn./mg)	čistenie	izolované (%)
východiskový materiál	58 000	1964	14,2.10 <sup>6</sup>	0,007.10 <sup>6</sup>	-	-
chromatografia na skle s regulovanou veľkosťou pórov	1 080	88,9	11,1.10 <sup>6</sup>	0,12.10 <sup>6</sup>	17	78,5
chromatografia na DEAE-celulóze	285	9,05	8,9.10 <sup>6</sup>	0,98.10 <sup>6</sup>	140	62,7
rýchla proteínová kvapalinová chromatografia na Mono Q	75	0,44	6,9.10 <sup>6</sup>	15,68.10 <sup>6</sup>	2240	48,6
preparatívna SDS PAG elektroforéza alebo HPLC na C4 na obrátených fázach	6	0,028	2,71.10 <sup>6</sup>	96,79.10 <sup>6</sup>	13387 <sup>+</sup>	19,1 <sup>+</sup>

+ Korigované na čiastočnú deštrukciu aktivity nádorového nekrotického faktora, ktorá je spôsobená SDS, kyselinou trifluóroctovou a propanolom

Na podávanie sa nádorový nekrotický faktor pripraví zmiešaním nádorového nekrotického faktora so žiadaným stupňom čistoty s fyziologicky prijateľnými nosičmi, t. j. nosičmi, ktoré v používaných dávkach a koncentráciách nie sú toxické. Obyčajne sa nádorový nekrotický faktor spojí s puframi, antioxidantmi, ako je napríklad kyselina askorbová, polypeptidy s nízkou molekulovou hmotnosťou (menej ako asi 10 skupín), proteínmi, aminokyselinami, cukrami vrátane glukózy alebo dextrínov, chelatačnými činidlami, ako je napríklad etyléndiaminotetraoctová kyselina (ED-TA), a inými stabilizátormi a excipientmi. Nosiče by mali byť formulované tak, aby stabilizovali nádorový nekrotický

faktor ako dimér a/alebo, výhodne, ako trimér. Toto je možné dosiahnuť tým, že sa soľ alebo detergenty nepoužívajú v takých koncentráciách, ktoré disociujú nádorový nekrotický faktor na monoméry. Tiež je potrebné sa vyhnúť takým podmienkam, pri ktorých nádorový nekrotický faktor agreguje do vyšších multimérov. Pri čistení, lyofilizácii alebo skladovaní vo vodných roztokoch sa preto obyčajne používa neiónové povrchovoaktívne činidlo, ako je napríklad Tween 20. Nádorový nekrotický faktor, ktorý sa používa na terapeutické účely, musí byť sterilný. Toto sa ľahko dosiahne filtráciou sterilnými filtračnými membránami.

Nádorový nekrotický faktor sa skladuje obyčajne v lyofilizovanej forme.

Nádorový nekrotický faktor sa prípadne používa v kombinácii s inými protinotvarovými činidlami, ako sú napríklad chemoterapeutické antibiotiká (aktinomycín-D, adriamycín, aklacinomycín A), alebo s činidlami, ktoré zvyšujú alebo stimulujú imúnnu odpoveď, napríklad s imunoglobulínmi, ako je gama-globulín, vrátane imunoglobulínov, ktoré majú afinitu na bunkové povrchy antigénov notvarov. Pretože interferóny pôsobia synergicky s nádorovým nekrotickým faktorom v testoch bunkovej lýzy, je žiaduce kombinovať alfa-, beta- alebo gama-interferóny s prostriedkami s nádorovým nekrotickým faktorom a lymfotoxinom. Typický prostriedok obsahuje nádorový nekrotický faktor a gama-interferón v takom pomere, aby jednotková účinnosť bola od asi 0,1 : 1 do asi 200 : 1, obyčajne 10 : 1; časť nádorového nekrotického faktora môže byť nahradená lymfotoxinom. Tieto pomery môžu byť upravené tak, ako to vyžaduje terapeutická skúsenosť.

Prostriedky s nádorovým nekrotickým faktorom sa podávajú živočíchom, ktoré majú nádory. Spôsob podávania je zhodný so známymi spôsobmi podávania, napríklad intravenózne, intraperitoneálne, intramuskulárne, vnútornou infúziou alebo injekciou sterilného roztoku nádorového nekrotického faktora a/alebo je možné použiť aj opísané systémy s pomalým uvoľňovaním nádorového nekrotického faktora. Nádorový nekrotický faktor sa podáva do miest poškodenia, t. j. priamo injekciou do pevných nádorov. V prípade rozosiťých nádorov, ako je napríklad leukémia, je výhodné podávať nádorový nekrotický faktor intravenózne alebo do lymfatického systému. Nádory orgánov v brušnej dutine, ako je napríklad rakovina vaječníkov, sa výhodne liečia intraperitoneálnou infúziou použitím prístrojov pre intraperitoneálnu dialýzu a tomu zodpovedajúcich roztokov. Obyčajne sa však nádorový nekrotický faktor podáva kontinuálnou infúziou, aj keď je prijateľné aj podávanie bolus injekcií.

Je žiaduce, aby nádorový nekrotický faktor bol podávaný vo forme implantovateľných prostriedkov pomaly ho uvoľňujúcich. Príkladmi vhodných systémov pre proteíny, ktoré majú molekulovú hmotnosť zodpovedajúcu dimérom alebo trimérom nádorového nekrotického faktora, sú kopolyméry L-glutamovej kyseliny a gama etyl-L-glutamátu (U. Sidman a spol.: Biopolymers 22(1), 547 až 556(1983)), poly-(2-hydroxyetylmetakrylát) (R. Langer a spol.: J. Biomed. Mater. Res. 15, 167 až 277 (1981) a R. Langer. Chem. Tech. 12, 98 až 105 (1982)) alebo etylén-vinylacetát (R. Langer a spol.: tamtiež). Tieto prostriedky sa implantujú do miest, z ktorých boli nádory chirurgicky odstránené. Nádorový nekrotický faktor sa taktiež používa v polopriepustných mikrotobolkách alebo lipozómoch pre injekčné podanie do nádorov. Tento spôsob podávania je zvlášť vhodný pri chirurgicky neodstrániteľných nádoroch, napr. pri mozgových nádoroch.

Množstvo nádorového nekrotického faktora, ktorého sa pri podávaní používa, závisí napríklad od spôsobu podávania, od typu nádorov a od stavu pacienta. Pri použití injekcie do miesta poškodenia je potrebné menšie množstvo nádorového nekrotického faktora (vzťahnuté na telesnú hmotnosť), ako pri intravenózne infúzií, pričom niektoré typy nádorov sú na nádorový nekrotický faktor rezistentnejšie ako iné typy, napr. leukemické. Budé teda nutné, aby terapeuti stanovili dávku a modifikovali spôsob podávania tak, ako je žiaduce na získanie optimálnej cytotoxickej účinnosti na cieľový nádor, to je možné stanoviť napríklad biopsiou nádoru alebo diagnostickými testami na údajné rakovinové znaky, ako je napríklad karcinoembryonný antigén, z pohľadu hociktorej rekombinantnej toxicity vo vyšších

dávkach. Bolo zistené, že dávky asi 120 µg na kg telesnej hmotnosti za deň pri myšiach pri intravenóznom podávaní sú obyčajne v podstate netoxické a účinné in vivo.

Predpokladá sa, že cytotoxická účinnosť nádorového nekrotického faktora nie je druhovo špecifická. To znamená, že sa pri terapii ľudských nádorov môže použiť i iný nádorový nekrotický faktor ako ľudský nádorový nekrotický faktor, napríklad nádorový nekrotický faktor z hovädzieho alebo bravčového zdroja. Je však žiaduce, aby bol používaný nádorový nekrotický faktor z tých druhov, ktoré sú nim liečené, aby sa zabránilo potenciálnej tvorbe autoprotilátok.

Na zjednodušenie príkladu bude na niektoré často sa vyskytujúce spôsoby odkazované krátkymi frázami.

Plazmidy sú označované malým p, za ktorým nasledujú veľké písmená a/alebo číslice. Východiskové plazmidy používané v tejto prihláške sú komerčne dostupné, sú verejne dostupné bez nejakých reštrikčných obmedzení alebo je ich možné z takýchto dostupných plazmidov skonštruovať podľa publikovaných spôsobov. Okrem toho sú v odbornej literatúre známe ekvivalentné plazmidy, ako je zrejme odborníkovi.

Pojem „štiepenie DNA“ sa týka katalytického štiepenia DNA enzýmom, ktorý pôsobí na istých miestach DNA. Taktéto enzýmy sa nazývajú reštrikčné enzýmy. Miesta, na ktoré sú tieto enzýmy špecifické, sa nazývajú reštrikčné miesta. Pojem „čiasťočné“ štiepenie znamená neúplné rozštiepenie reštrikčným enzýmom, t. j. štiepenie prebieha za takých podmienok, že niektoré miesta, ale nie všetky, v DNA substráte sú štiepené danou reštrikčnou endonukleázou. Rôzne reštrikčné enzýmy, ktoré sa tu používajú, sú komerčne dostupné. Pri ich používaní sa postupuje podľa návodu dodávateľa enzýmov, pokiaľ ide o reakčné podmienky, kofaktory a ďalšie požiadavky. Reštrikčné enzýmy sú obyčajne označené skratkami, ktoré sa skladajú z veľkého písmena, po ktorom nasledujú ďalšie písmená, a potom obyčajne číslo reprezentujúce organizmus, z ktorého bol reštrikčný enzým pôvodne získaný. Obyčajne sa pracuje s asi 1 µg plazmidu alebo fragmentu DNA a asi jednou jednotkou enzýmu v asi 20 µl pufrovaného roztoku. Množstvo príslušných pufrov a substrátov pre ten ktorý reštrikčný enzým sú dané výrobcom. Obyčajne sa pracuje pri inkubačnom čase asi jednu hodinu pri teplote 37 °C, ale oboje sa môže meniť podľa inštrukcií dodávateľov. Po inkubácii sa proteín odstráni extrakciou fenolom a chloroformom a štiepená nukleová kyselina sa z vodnej frakcie izoluje vytrážením etanolom. Po štiepení reštrikčným enzýmom nasleduje niekedy hydrolýza terminálneho 5' fosfátu bakteriálnou alkalickou fosfatázou, aby sa zabránilo tomu, aby reštrikčné rozštiepené konce fragmentu DNA znova „scirkularizovali“ alebo aby sa vytvorili uzavreté slučky, čo by prekázalo inzerciu iného fragmentu DNA do reštrikčne rozštiepeného miesta. Pokiaľ nie je inak uvedené, nasleduje po štiepení plazmidov defosforylácia na 5' konci. Pre defosforyláciu sa používajú konvenčné postupy a činidlá (T. Maniatis a spol.: Molecular Cloning, str. 133 až 134 (1982)).

Pojem „izolácia“ daného fragmentu DNA z reštrikčného štiepenia znamená, že sa rozštiepená časť oddelí elektroforézou na polyakrylamidovom géli. Fragment, o ktorý sa zaujímate, sa identifikuje porovnaním jeho pohyblivosti s fragmentmi o známej molekulovej hmotnosti, odstráni sa sekcia gélu obsahujúca žiadaný fragment a gél sa oddelí od DNA. Tento postup je všeobecne známy. Pozri napríklad R. Lawn a spol.: Nucleic Acids Res. 9, 6103 až 6114 (1981) a D. Goeddel a spol.: Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980).

„Southernova analýza“ je spôsob, ktorým sa prítomnosť sekvencií DNA v rozštiepenej časti alebo v prostriedku obsahujúcom DNA potvrdí hybridizáciou na známy

značený oligonukleotid alebo známy fragment DNA. Souternova analýza tu bude znamenať rozdelenie štepov na 1 % agaróze, denaturáciu a prenesenie na nitrocelulózu spôsobom podľa E. Southern. *J. Mol. Biol.* 98, 503 až 517 (1975) a hybridizáciu tak, ako ju opísal T. Maniatis a spol.: *Cell* 15, 687 až 701 (1978).

Pojem „transformácia“ znamená zavedenie DNA do organizmu tak, že DNA je schopná replikácie a to buď ako mimochromozómalný prvok, alebo ako integrálna časť chromozómu. Pokiaľ nie je inak uvedené, potom spôsob použitý v tejto prihláške pre transformáciu *E. coli* je spôsob s chloridom vápenatým podľa Mandela a spol.: *J. Mol. Biol.* 53, 154 (1970).

Pojem „ligácia“ označuje proces tvorenia fosfodiesterových väzieb medzi dvoma fragmentmi dvojvláknovej nukleovej kyseliny (T. Maniatis a spol.: tamtiež, str. 146). Pokiaľ nie je inak uvedené, robí sa ligácia s použitím známych pufov a za známych podmienok s 10 jednotkami T4 DNA ligázy („ligasa“) a 0,5 µg približne ekvimolárných množstiev fragmentov DNA, ktoré majú byť ligované.

Pod pojmom „príprava“ DNA z transformantov sa rozumie izolácia plazmidovej DNA z mikrobiálnej kultúry. Pokiaľ nie je inak uvedené, môže sa použiť alkalický/SDS spôsob podľa Maniatisa a spol. tamtiež, str. 90.

Pojem „oligonukleotidy“ znamená krátke jednovláknové alebo dvojvláknové polydeoxynukleotidy, ktoré sa chemicky syntetizujú známymi spôsobmi, pričom sa vyčistia na polyakrylamidových géloch.

Všetky citácie literatúry sú tu výslovne zahrnuté ako odkazy.

### Prehľad obrázkov na výkresoch

Obrázok 1 ukazuje elučný profil nádorového nekrotického faktora pri elúcii zo skla s kontrolovanou veľkosťou pórov.

Obrázok 2 ukazuje elučný profil nádorového nekrotického faktora z dietylamoetylcelulózy.

Obrázok 3 ukazuje elučný profil nádorového nekrotického faktora z rýchlej proteínovej kvapalinovej chromatografie.

Obrázok 4 ukazuje elučný profil nádorového nekrotického faktora pri chromatofokusácii.

Obrázok 5 ukazuje molekulovú hmotnosť nádorového nekrotického faktora podľa SDS PAGE gélovej elektroforézy.

Obrázok 6 ukazuje molekulovú hmotnosť nádorového nekrotického faktora podľa HPLC elúcie.

Obrázok 7 ukazuje elučný profil nádorového nekrotického faktora z kolóny HPLC C4.

Obrázok 8 ilustruje rozdelenie fragmentov nádorového nekrotického faktora po štiepení trypsinom na HPLC.

Obrázok 9 ilustruje cytotoxický efekt zmesi gama-interferónu s nádorovým nekrotickým faktorom.

Obrázok 10 uvádza nukleotidovú a aminokyselinovú sekvenciu pre-ľudského nádorového nekrotického faktora vrátane úplného sekrečného leader nádorového nekrotického faktora.

Obrázok 11 ukazuje konštrukciu expresného vektora nádorového nekrotického faktora.

### Príkladu uskutočnenia vynálezu

#### Príklad 1

##### Testy

Špecifická účinnosť nádorového nekrotického faktora sa stanovuje opísaným modifikovaným testom lýzie buniek (B.

Spofford: *J. Immunol.* 112, 2111 (1974)). Myšie fibroblastové bunky L-929 (ATCC CCL-929) sa kultivujú v 96 jamkách misiek s plochým dnom (3040), (Falcon Plastics, Oxford, Ca., USA) v množstve 30 000 buniek (objem 0,1 ml) na jamku za prítomnosti 1/µg/ml aktinomycínu D a seriálovo zriedenej testovanej vzorky (0,125 ml). Bunky sa inkubujú vo vlhkej atmosfére pri teplote 37 °C s 5 % oxidu uhličitého. Testovaná vzorka sa po 18 hodinách odstráni, dosky sa premyjú a lýzia buniek sa stanoví vyfarbením dosiek 0,5 % roztokom kryštálovej violete v zmesi metanol-voda (1 : 4, objemové diely). Koncový bod mikrotitrovacích dosiek bol stanovený pomocou prístroja Microelisa autoreader (firmy Dynatech) zameraním absorpcie pri 450 nm a transmisie pri 570 nm. Bunky, ktoré boli kultivované len v samotnom kultivačnom médiu, mali 0 % lýziu, bunky, ktoré boli kultivované s 3M roztokom hydrochloridu guanidínu, mali 100 % lýziu. Jedna jednotka nádorového nekrotického faktora sa definuje ako také množstvo nádorového nekrotického faktora (ak je testovaný v objeme 0,125 ml), ktoré je potrebné na lýziu 50 % buniek.

Nádorový nekrotický faktor bol testovaný tiež testom nekrózy nádoru in vivo. V stručnosti - tento test sa robí tak, že bunky Meth A Sarcoma (5.10<sup>5</sup> buniek) sa nechajú rásť v myších samiciach CB6F<sub>1</sub> (BALB/c x C57BL/6)F<sub>1</sub> počas siedmich až desiatich dní. Vzorka nádorového nekrotického faktora sa potom podá injekčne do nádoru. Po 24 hodinách sa myši usmrtna prerušením ciev, nádory sa odstránia a nekróza sa vyhodnotí histologicky, ako je opísané E. Carswellom a spol. v *Proc. Natl. Acad. USA* 72, 3666 až 3670 (1975).

#### Príklad 2

Využitie PBLs alebo monocytických bunkových línií na syntézu nádorového nekrotického faktora.

V dvojlitrových guľatých bankách (890 cm<sup>2</sup>) sa v 500 ml média RPMI 1640 (Irvine Scientific, Santa Ana, Kalifornia, USA), ktoré obsahuje 10 mM HEPES, 0,05 mM β-merkaptotanol, 100 jednotiek penicilínu na mililitr, 100 µg streptomycínu na ml a 10 % fetálneho tefaciebo séra, nechá rásť línia ľudských promyelotických buniek HL-60 s bunkovou hustotou 1.10<sup>5</sup> buniek na mililitr. Po troch dňoch pri teplote 37° C, keď bunková hustota stúpila na 8 až 12.10<sup>5</sup> buniek/ml, sa bunky izolujú odstredovaním pri 1000 G počas 10 minút, premyjú sa dvakrát bezsérovým médiom RPMI 1640 a prenesú sa do rovnakého opísaného média v bunkovej hustote 15 až 20.10<sup>5</sup> buniek na mililitr. Bunky sa kultivujú v dvojlitrových guľatých bankách za prítomnosti 10 ng/ml PMA. Po 16 až 24 hodinách sa bunky odfiltrujú 3 µm filtrom Scalkleen (Pall Trinity Micro Corp. Cortland, N. Y. USA). Číry filtrát sa testuje na aktivitu nádorového nekrotického faktora, vyčistí sa a charakterizuje. Týmto postupom sa získa asi 400 jednotiek nádorového nekrotického faktora na mililitr supernatantu kultivačného média.

Pre produkciu nádorového nekrotického faktora sa používajú tiež ľudské periférne krvné monocyty. Krv, z ktorej boli odstránené krvné doštičky, je možné dostať od amerického červeného kríža (American Red Cross, Boston, Ma., USA). Táto krv sa použije do 24 hodín od získania. Najskôr sa oddelia monocyty od erytrocytov odstredovaním na Ficoll-Hypaque gradientoch pri 1000 G počas 30 minút. Získané bunky sa premyjú trikrát soľným roztokom fosfátového pufru. Monocyty od každého darcu boli oddelene kultivované v dvojlitrových guľatých bankách v bezsérovom médiu RPMI 1640 na bunkovú hustotu 2,5.10<sup>6</sup> buniek na mililitr. Ku kultúre sa pridá 1 µg/ml stafylokokového enterotoxínu B(SEB) a 1 µg/ml rekombinantného tymozínu α-1. Bunky sa potom inkubujú vo vlhkej atmosfére pri 37 °C s 10 % oxidu

uhlíčitého. Po 24 až 72 hodinách, podľa typu donoru, sa bunkové supernatanty izolujú a spracujú sa rovnakým spôsobom ako supernatanty odvodené od bunkovej línie HL-60. Výťažky nádorového nekrotického faktora z kultúr PBL sa značne rôznia podľa použitého indukčného činidla. Ak sa k opísanému indukčnému systému pridá PMA, zvýši sa cytolytická účinnosť bunkových supernatantov. Bunkové supernatanty však obsahoval tak nádorový nekrotický faktor, ako aj lymfotoxín. Stanovenie nádorového nekrotického faktora alebo lymfotoxínu v zmesi nádorového nekrotického faktora a lymfotoxínu sa robí tak, že sa urobí test lýzie buniek testovanou vzorkou, ktorá bola predtým inkubovaná s králičou neutralizujúcou protilátkou na nádorový nekrotický faktor alebo lymfotoxín, pričom sa stanoví zvyšková aktivita v teste lýzie buniek L-929.

#### Príklad 3

Chromatografia na sklenených perličkách s regulovanou veľkosťou pórov.

Aktivita nádorového nekrotického faktora z bunkovej kultúry sa po dávkach adsorbuje na sklenených perličkách s regulovanou veľkosťou pórov (č. katalógu GPG 00350, Electro-Nucleonics, Fairfield, NJ, USA) ekvilibrovaným pufróm s 10 mM fosforečnanom sodným, pH 8,0 za stáleho miešania pri teplote 4 °C. Na 5 litrov média sa použije 100 ml sklenených perličiek. Po jednohodinovom miešaní sa perličky nechajú usadiť a supernatant sa dekantuje. Za teploty miestnosti sa potom perličkami naplní kolóna (5 x 50 cm). Kolóna sa premyje pufróm 10 mM fosforečnanu sodného, pH 8,0, ktorý obsahuje 1M chlorid sodný. Aktivita nádorového nekrotického faktora sa zo sklenených perličiek eluuje 20 % etylglykolom v pufré 10 nM fosforečnanu sodného, pH 8,0, ktorý obsahuje 1M chlorid sodný. Elučný profil supernatantu HL-60 z kolóny je uvedený na obrázku 1.

#### Príklad 4

Chromatografia na DEAE celulóze

Eluát z príkladu 3 sa priamo aplikuje na kolónu veľkosti 2,5 x 20 cm s DEAE celulózou 53 (Whatman) ekvilibrovanou 10 mM pufróm fosforečnanu sodného, pH 8,0 a 0,01 % Tweenu 20 pri prietoku približne 50 ml/hodinu. Prietok sa upraví na 100 ml/h. Na kolónu sa nanesie 1,080 ml vzorky so  $4,2 \cdot 10^6$  jednotiek nádorového nekrotického faktora pri 4 °C. Kolóna sa premyje ekvilibračným pufróm a eluuje sa stupňovým gradientom 75 mM, 150 mM a 500 mM chloridu sodného v 10 mM fosforečnanovom pufré, pH 8,0. Zisťuje sa absorbancia eluátu pri 280 nm a účinnosť nádorového nekrotického faktora ako funkcie eluovaných frakcií. Výsledky sú uvedené na obrázku 2.

#### Príklad 5

Rýchla proteínová kvapalinová chromatografia

Frakcie s aktivitou nádorového nekrotického faktora z príkladu 4 sa zahustia a dialyzujú sa proti 20 mM Tris-HCl, pH 8,0 obsahujúci 0,01% Tween 20 a 1 mM azid sodný (pufer A) v bunke Amicon s membránou YM-10 alebo s inou dialyzačnou membránou s molekulovými hmotnosťami nižšími ako je molekulová hmotnosť nádorového nekrotického faktora. Membrána sa premyje dvakrát pufróm A. Kolóna s perličkami Sepharosy, ktorá je substituovaná kvartérnou amóniovou skupinou (perličky s veľkosťou 9,8 μm, kolóna 5 x 0,5 cm, predáva sa pod označením Mono Q resin firmou Pharmacia), v jednotke rýchlej proteínovej kvapalinovej chromatografie (FPLC, fy. Pharmacia) s gradientovým programátorom (GP-250) a dvoma pumpami (P-500) sa najskôr ekvilibruje dialyzačnými puframi

cez superslučku pri prietoku 1 ml/min., ako je opísané J. Richeym v American Laboratory, strana 1, október 1982. Kolóna sa naplní spojenými premývacími podielmi s dialyzačným koncentrátom. Kolóna sa premyje pufróm A. Potom sa kolóna eluuje lineárnym gradientom 40 až 75 mM chloridu sodného v pufré A. Lineárny gradient bol naprogramovaný nasledujúcim spôsobom. 0 až 5 minút, ekvilibračný pufer; 5,1 až 15 minút, 25 mM chlorid sodný, 15,1 až 25 minút; 40 mM chlorid sodný, 25 až 60 minút; 75 mM chlorid sodný, 65,1 až 70 minút; 100 mM chlorid sodný, 70 až 80 minút; lineárny gradient 100 až 1000 mM chloridu sodného, 80 až 90 minút; 100r mM chlorid sodný 90,1 až 110 minút, ekvilibračný pufer. Eluát sa odoberá vo frakciách po dvoch mililitroch. Zisťuje sa absorbancia eluátu pri 280 nm, jeho vodivosť a účinnosť nádorového nekrotického faktora. Výsledky sú uvedené na obrázku 3.

#### Príklad 6

Chromatofokusácia

Chromatofokusácia sa robí na kolóne Pharmacia Mono P s veľkosťou 20 x 0,5 cm systémom FPLC ako v príklade 5. Biologicky aktívna frakcia (pokiaľ ide o nádorový nekrotický faktor), ktorá eluuje ako frakcia 37 až 45 v príklade 5, sa skoncentruje a dialyzuje na bunke „Amicon stir cell“ s membránou YM-10 proti kolóne ekvilibračného pufru, t. j. 0,025M bis-Tris HCl, pH 6,7. Vzorka sa nanesie na kolónu Mono P pri teplote miestnosti cez superslučku pri prietoku jeden mililiter za minútu. Kolóna sa premyva ekvilibračným pufróm pokiaľ sa absorbancia pri 280 nm nevráti na základnú hodnotu. Potom sa eluuje lineárnym gradientom pH (kolóna sa premyva 7,5 % polypufróm 74 pri pH 4,7 (Pharmacia)). Odoberajú sa frakcie po 1 ml a meria sa ich absorbancia pri 280 nm a pH. Výsledky sú uvedené na obrázku 4. Ako je vidno z obrázka 4, izoelektrický bod nádorového nekrotického faktora je asi 5,3.

#### Príklad 7

Preparatívna SDS elektroforéza na polyakrylamidovom géli

Modifikáciou postupu podľa U. Laemmliho: Nature 227, 680 až 685 (1970) sa pripraví 15 % polyakrylamidové gély (11 x 16 cm) o hrúbke 1,5 až 3,0 mm. Deliace aj vrstvené gély obsahovali 0,1% SDS a 0,05 % Tween 20. Ďalšie pufrý a koncentrácia skříženého naviazaného činidla boli rovnaké ako pri analytických SDS-PAGE géloch. Frakcie s aktivitou nádorového nekrotického faktora z príkladu 5 alebo 6 sa spoja, skoncentrujú a dialyzujú proti 6,25 M tris-HCl, pH 7,0, obsahujúce 0,005 % SDS na bunke „Amicon stir cell“ s membránou YM-10. Po odstránení dialyzovaného koncentrátu sa membrána premyje trikrát malým množstvom vzorky pufru (0,2 % SDS, 0,02 % Tween 20, 30 % glycerol, 0,03 M Tris HCl, pH 6,8, 0,005 stopové farbivo). Dialyzovaný koncentrát a premyté podiely sa spoja. Celkový objem je 1 až 4 ml. Na dosiahnutie SDS PAGE redukujúcich podmienok sa prípadne pridá merkaptotanol a vzorka sa nanesie do veľkej jamky vo vrstvenom géli. Malé jamky priľahlé k jamke so vzorkou sa použijú pre označenie rôznych molekulových hmotností pomocou fosforylázy (94 000) hovädzieho sérumalbumínu (67 000), ovaalbumínu (43 000), uhličitanevej anhydrázy (30 000), inhibítora trypsinu zo sójových bôbov (20 000) a lyzozómu (14 000). Elektroforéza gélov sa uskutočňovala vo vertikálnom elektroforetickom systéme Biorad ochladenom na 12 °C za konštantného prúdu 20 mA na mm hrúbky gélu pokiaľ farbivo nedosiahlo koniec gélu.

Po elektroforéze sa jedna zo sklenených dosiek odstráni z gélu. Zaznamená sa poloha vzorky s danou molekulovou hmotnosťou. Pás, ktorý obsahuje aplikovanú vzorku ná-

dorového nekrotického faktora, sa potom rozreže na 0,25 cm sekcie podľa molekulových hmotností tak, ako sa zadali proteíny, ktoré boli použité ako vzorky. Tieto pásy gélu sa potom umiestnia do polypropylénových trubíc, ktoré obsahujú 1 až 2 ml 10 mM hydrogénuhličitanu amónneho a 0,01 % Tween 20, pH 8, a nechajú sa eluovať 16 hodín pri teplote 4 °C. Tieto eluáty sa potom testujú na účinnosť nádorového nekrotického faktora. Výsledky sú uvedené na obrázku 5. Molekulová hmotnosť nádorového nekrotického faktora na SDS géli bola asi 17 000 za redukujúcich a neredukujúcich podmienok, čo naznačuje, že ide o molekulu s jednoduchým reťazcom.

Proteín bez solí a bez látok s nízkou molekulovou hmotnosťou sa izoluje z eluátu páskov gélu nasledujúcim postupom. Pripraví sa malé kolóny, ktoré obsahujú 0,2 ml živice Sep-pak C18, ktorá bola predtým prmytá acetonitrilom, 1-propanolom, 1 % kyselinou trifluóroctovou (TFA) a destilovanou vodou. Potom sa ekvilibruje 10 mM hydrogénuhličitanom amónnym obsahujúcim 0,01 % Tween 80, pH 8,0. Eluát z gélu sa nanesie na kolónu. Eluát z kolóny sa spojí. Živica sa potom premyje približne 5 ml destilovanej vody a 5 ml 0,1 % kyseliny trifluóroctovej, čím sa odstráni voľné aminokyseliny a soli pufru. Nádorový nekrotický faktor sa zo živice eluuje 1 ml 50 % 1-propanolu v 0,1 % kyseline trifluóroctovej. Živica sa potom eluuje ďalším 1 ml 50 % 1-propanolu v 1 % kyseline trifluóroctovej, proteín sa však obyčajne eluuje už prvým pufrom. V tomto stupni dochádza približne k 80 % inaktivácii bioaktivity nádorového nekrotického faktora. Aj keď takto získaný nádorový nekrotický faktor sa môže použiť pre sekvenčnú analýzu, je výhodné použiť na tento účel eluent z HPLC opísanej v príklade 8.

#### Príklad 8

Vysokotlaková kvapalinová chromatografia

Molekulová hmotnosť prírodného nádorového nekrotického faktora sa stanoví vysokotlakovou gélovou chromatografiou. Chromatografia sa robí pri teplote miestnosti na HPLC kolóne (Alltech Associates, Deerfield, IL, USA) s veľkosťou 7,5 x 60 mm s gélom TSK 62000 SW. Jeden mililiter vzorky vyčistenej podľa príkladu 5, ktorý obsahuje približne 1 µg proteínu a 15 600 jednotiek aktivity sa izokraticky eluuje z kolóny s gélom pufrom (0,2M fosforečnan sodný, pH 7,0) pri prietoku 0,5 ml/minútu. Kolóna sa kalibruje hovädzím sérumalbumínom (molekulová hmotnosť 66 000), o-ovalbumínom (molekulová hmotnosť 45 000), hovädzou uhličitanovou anhydrázou B (molekulová hmotnosť 29 000) a lyzozómom (molekulová hmotnosť 14 300). Odoberajú sa jednomililitrové frakcie, ktoré sa testujú na aktivitu nádorového nekrotického faktora, eluujú sa v rozsahu molekulových hmotností 45 000 ± 6000 (pozri obrázok 6).

#### Príklad 9

HPLC na obrátených fázach

Nádorový nekrotický faktor sa čistí taktiež HPLC na obrátených fázach na kolónach C4 Synchronpak na chromatografickom systéme Water Associates, Inc. ako je už opísané (W. Kohr a spol.: Anal. Biochem. 122, 348 až 359 (1982)). Maximum proteínov bolo zistené pri 210 nm a pri 280 nm po elúcii lineárnym gradientom 1 až 23 % (objemové percentá) 1-propanol v 0,1% vodnej kyseline trifluóroctovej počas prvých 15 minút a s 23 až 30 % 1-propanolu v 0,1 % vodnej kyseline trifluóroctovej počas ďalších 15 minút pri prietoku jeden mililiter za minútu. Testuje sa cytolytické aktivity maxim. Vplyvom organických rozpúšťadiel, ktoré sa používajú pri elúcii nádorového nekrotického faktora z kolóny C4, sa aktivita nádorového nekro-

tického faktora znížila o asi 80 %. Nádorový nekrotický faktor, ktorý bol vyčistený podľa tohto spôsobu, sa vysuší vo vákuu a potom sa podrobí aminokyselinovej analýze a sekvenovaniu. Výsledky sú uvedené na obrázku 7. Obrázok 7 ukazuje, že nádorový nekrotický faktor, ktorý sa získal z eluentu z príkladu 5, obsahuje biologicky neaktívne proteínové príslady, ktoré sa eluujú s retenčnými časmi asi 16 až 19 minút. Podľa kritéria aminoterminálnej sekvencie je bioaktívny eluent z C4-RP-HPLC v podstate homogénny.

#### Príklad 10

Určenie čiastočnej sekvencie aminokyselín nádorového nekrotického faktora

Nádorový nekrotický faktor sa štiepi trypsinom nasledujúcim spôsobom. Homogénny nádorový faktor z príkladu 9 sa rozpustí, vysuší a znova rozpustí v pufrí (100 mM hydrogénuhličitan amónny, pI 8,0) obsahujúcim 5 hmotn. % trypsinu TPCK (Worthington Biochemicals), 1 mM CaCl<sub>2</sub> a 0,1 % Tween 20. Pomer enzýmu k substrátu je 1 : 20, inkubácia prebieha 6 hodín pri 37 °C. Reakčná zmes sa rozdelí na peptidové fragmenty na C4 HPLC. Výsledky sú uvedené na obrázku 8. Pozoruje sa celkom 9 fragmentov. Fragmenty 2 a 2 sa eluujú spoločne ako maximum, ktoré je na obrázku 8 označené T2. Predpokladá sa, že ďalších 10 fragmentov sa kolónou nezadrží. Sekvencie aminokyselín neporušeného nádorového nekrotického faktora z príkladov 8 a 9 a fragmenty hydrolyzy trypsinom v tomto príklade sa stanoví automatickou sekvenčnou Edmanovou degradáciou modifikovaným prístrojom Beckman sequencer model 890B opatreným vymrazovačom. Ako nosič v tégluku sa používa polybrén (1,25 mg). Podľa zloženia aminokyselín neporušenej molekuly je molekulová hmotnosť neporušeného nádorového faktora 17 000. Toto číslo je súhlasné s údajmi SDS-PAGE a potvrdzuje neprítomnosť glykozylácie.

#### Príklad 11

Synergické pôsobenie nádorového nekrotického faktora a τ-interferónu

Na mikrotitrovaciu dosku sa vysejú bunky myšacieho melanómu B16 (Mason Research, Worcester, Ma., USA), bunková línia pôvodu C57B1/6, v množstve 5 000 buniek na jamku a inkubujú sa 4 hodiny pri teplote 37 °C vo vlhkom inkubátore s 5 % oxidu uhličitého pred pridaním lymfokínov. Nádorový nekrotický faktor, získaný podľa príkladu 1, sa vyčistí HPLC v podstate do homogenity a jeho účinnosť sa kvantitatívne stanoví opísaným testom cytolyzy buniek L929. Podobne sa vyčistený rekombinantný myšací τ-interferón (P. Gray a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 5842 až 5846 (1983)) testuje na protivírusovú účinnosť na EMC-infektovaných L-bunkách (D. Goeddel a spol.: Nature (Londýn) 287, 411 až 416 (1980)). Myšací τ-interferón a ľudský nádorový nekrotický faktor sa oddelene zriedia na zriedenia uvedené na obrázku 10. Do označených jamiek sa pridá najskôr gama interferón, potom sa ihneď pridá zriedený nádorový nekrotický faktor na konečný objem 0,2 ml na jamku. Po 72 hodinách inkubácie sa bunky zafarbia 0,5 % kryštálovou violetou v 20 % metanole. Výsledky sú uvedené na obrázku 10. B16 je relatívne rezistentný ako na samotný nádorový nekrotický faktor INF-τ; v dávke 1000 jednotiek/ml nádorového nekrotického faktora nebola pozorovaná žiadna viditeľná cytolyza. Pridaním veľmi malých množstiev gama interferónu (takých malých ako je 5 jednotiek) však už nastala cytolyza.

#### Príklad 12

Izolácia mRNA

Celková RNA z kultúry buniek HL-60 (4 hodiny po PMA indukcii) alebo z periférnych krvných lymfocytov kultivovaných ako je opísané v príklade 2, sa extrahuje v podstate podľa Warda a spol.: *J. Virol.* 9, 61 (1972). Bunky sa odstreďovaním peletujú a potom sa resuspendujú v 10 mM chloridu sodného, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5 a 1,5 mM chloridu horečnatom. Pridaním NP-40 na konečnú koncentráciu 1 % dôjde k lýzii buniek. Jadrá sa odstreďovaním peletujú. Supernatant obsahuje celkovú RNA, ktorá sa ďalej vyčistí mnohonásobnou extrakciou fenolom a chloroformom. Vodná fáza sa upraví tak, aby bola 0,2M na chlorid sodný. Celková RNA sa vyzráža pridaním dvoch objemov etanolu. Z 1 g kultivovaných buniek je typický výťažok asi 6 mg celkovej RNA. Spôsobom podľa H. Aviva a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1403 až 1412 (1972) sa získa asi 100 µg polyadenylovanej mRNA na oligo/dT/celulóze.

#### Príklad 13

##### Bunka cDNA

Postupným pôsobením rezervnej transkriptázy, Klenovovho fragmentu DNA polymerázy a SI nukleázy so 7,5 µg poly(A)<sup>+</sup> mRNA z príkladu 12 prevedie sa na dvojitú vláknovú cDNA (P. Gray a spol. *Nature* 295, 503 až 508 (1982), M. Wickers a spol.: *J. Biol. Chem.* 253, 2483 až 2495 (1978)). Z polyakrylamidového gélu sa izoluje 80 ng cDNA s dĺžkou väčšou ako 600 párov nukleotidov.

Na cDNA sa liguje syntetická DNA adaptorová sekvencia

5' AATTCATGCGTTCTTACAG 3'  
3' GTACGCAAGAATGTC 5'

Vytvorí sa kohezívny koniec EcoRI. Ako je obvyklé pre odborníkov, adaptor sa chemicky syntetizuje ako dve oddelené vlákna, 5' koniec jedného z vlákien sa fosforyluje polynukleotid-kinázou a obidve vlákna sa anelujú. Z polyakrylamidového gélu sa potom znova izoluje cDNA (20 ng), ligáciou sa vloží do λ gt-10 rozštiepeného EcoRI, zabalí sa do fágových častíc a množí sa v *E. coli* kmeni C600 hfl (Huynh a spol.: „Practical Approaches in Biochemistry“, IRL Press Ltd., Oxford, Anglia, 1984), alebo v inom známom kmeni, ktorý je vhodný pre množenie lambda fágov. Získa sa tak banka cDNA s asi 200 000 nezávislými kmeňmi.

#### Príklad 14

##### Príprava deoxy nukleotidovej sondy pre cDNA nádorového nekrotického faktora

Na základe publikovanej frekvencie používaných kodónov (R. Grantahm a spol.: *Nucleic Acids Res.* 9, 43 až 474 (1981)) výhodnosti ľudského IFN-τ (P. Gray a spol.: *Nature* 295, 503 až 508 (1982)) a ľudského lymfotoxínu bola zostavená hybridizačná sonda DNA so 42 nukleotidmi, založená na predbežnej sekvencii aminokyselín trypsínového peptidu TD-6 (E-T-P-E-G-A-E-K-P-W-Y-E-K) nádorového nekrotického faktora. Predbežná sekvencia má chybu (konecové K by malo byť P). Napriek tomu táto sekvencia vedie k úspešnej sonde. Syntetická sonda má sekvenciu 5' dGAAAC-CCCTGAAGGGTGCCAACCCTGGTATGAAAAG 3' a syntetizuje sa spôsobom podľa R. Greu a spol.: *Nucl. Acids Res.* 8, 2331 až 2348 (1980). Sonda sa fosforyluje pôsobením  $\tau^{32}\text{P}/\text{ATP}$  a T4 polynukleotid kinázou opísaným spôsobom (Goeddel a spol.: *Nature* 281, 544 (1979)).

#### Príklad 15

##### Identifikácia cDNA klonu, ktorý obsahuje sekvencie kódujúce nádorový nekrotický faktor

Asi 200 000 rekombinantných fágov z banky gt 10 cDNA sa testuje DNA hybridizáciou s použitím  $^{32}\text{P}$ -značeného 42-méru z príkladu 14 za nízko selektívnych podmienok podľa A. Ullricha a spol.: *EMBO J.* 3, 361 až 364 (1984) (alebo taktiež P. Gray a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 5842 až 5846 (1983), S. Anderson a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 6836 až 6842 (1983) a M. Jaze a spol.: *Nucleic Acids Res.* 11, 2325 až 2335 (1983)). Deväť rôznych klonov sa hybridizuje sondou a vyčistí sa cez jednotlivé plaky. Pomocou mRNA z neindukovaných buniek HL-60 sa pripraví cDNA značená  $^{32}\text{P}$ . DNA zo siedmich z týchto deviatich klonov fágov sa nehybridizuje týmito „neindukovanými“ sondami. Sú preto považované za kandidátov sekvencií cDNA nádorového nekrotického faktora. Klon cDNA, ktorý obsahuje najväčší inzert, sa označí λ 42-4, ktorý sa sekvenuje didoxy-spôsobom (A. Smith: *Methods in Enzymology* 65, 560 až 580 (1980) a F. Sanger a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463 až 5467 (1977)) po subklonovaní do vektora M13mp8 (J. Messing a spol.: *Nucleic Acids Res.* 9, 309 až 321 (1981)).

Sekvencia cDNA získaná z λ 42-4 obsahuje úplnú kódovaciu oblasť maturovaného nádorového nekrotického faktora a časť jeho signálneho peptidu. Správna orientácia a čítacia oblasť DNA boli odvodené porovnaním so sekvenciou aminokyselín trypsínového peptidu T4 nádorového nekrotického faktora. Valínová skupina na aminovom konci nádorového nekrotického faktora je označená ako aminokyselina 1. V čítacej oblasti nasleduje 156 ďalších aminokyselín a terminačný kodón. Vypočítaná molekulová hmotnosť je 17 356.

#### Príklad 16

##### Identifikácia klonu cDNA obsahujúca sekvencie kódujúce úplný prenášateľský nekrotický faktor

Klon cDNA λ 42-4 obsahuje úplnú kódujúcu oblasť maturovaného nádorového nekrotického faktora, chýba tam však sekvencia kódujúca úplný signálny peptid, ako je zrejme z toho, že chýba iniciačný kodón. Aby sa získala chýbajúca sekvenčná informácia, syntetizuje sa chemicky hexadekanukleotidový primér dTGGATGTTCGCTCCTCC (doplňkový k nukleotidom 855 až 870, obrázok 10). Tento primér sa aneluje k mRNA z príkladu 12. Potom sa spôsobom podľa príkladu 13 syntetizuje cDNA. Spôsobom opísaným v príklade 13 sa pripraví v gt10 nová banka a asi 200 000 klonmi cDNA. Táto banka sa testuje hybridizačnou analýzou s použitím sondy λ 42-4 cDNA inzertu značeného  $^{32}\text{P}$ . Získa sa 16 pozitívnych klonov. Najdlhší z týchto klonov, λ 16-4, obsahuje inzert cDNA, ktorý je na 5 strane dlhší o 337 párov nukleotidov ako inzert λ 42-4. Zloženie sekvencie cDNA inzertov nádorového nekrotického faktora λ 16-4 (nukleotidy 1 až 870) a λ 42-4 (nukleotidy 337 až 1643) je uvedené na obrázku 10.

#### Príklad 17

##### Konštrukcia expresného vektora pre priamu expresiu nádorového nekrotického faktora

Postup, ktorý bol použitý pre expresiu sekvencie cDNA nádorového nekrotického faktora získanej v príklade 15, je uvedený na obrázku 11. Fág λ 42-4 z príkladu 15, ktorý obsahuje kódujúcu sekvenciu úplného maturovaného nádorového nekrotického faktora a časť údajného sekrečného leadera nádorového nekrotického faktora, sa rozštiepi pôsobením EcoRI. Izoluje sa fragment s približne 800 párami nukleotidov, ktorý obsahuje kódujúcu oblasť nádorového nekrotického faktora. Tento fragment sa rozštiepi pôsobením Ava I a Hind III. Izoluje sa fragment so 578 párami nukleotidov, ktorý je na obrázku 11 označený „C“. Tento frag-

ment kóduje aminokyseliny 8 až 158 nádorového nekrotického faktora.

Prípravajú sa dva syntetické deoxynukleotidy (na obrázku 11 označené ako fragment „B“, pozri konštrukcie sekvencie adaptoru v príklade 13), ktoré zahŕňajú kohezívny koniec XbaI na 5' konci a kohezívny koniec na 3' konci, iniciálny kodón met a kodóny prvých siedmich aminokyselín na aminovom konci nádorového nekrotického faktora. Kodóny týchto aminokyselín sa vyberú na základe výhodnosti pre *E. coli*. Sekvencia AATT proti smeru začiatočného kodónu sa vyberie tak, aby sa patrične umiestnil začiatočný kodón od trp ribozómovej väzbovej sekvencie a aby v kombinácii s kodónmi aminokyselín eliminovala potenciálnu slučku messenger RNA.

Trojnásobnou ligáciou sa potom segmenty B a C spoja s derivátom pBR322, ktorý obsahuje sekvenciu promotóra s Shine-Dalgarno sekvenciou trp leader peptidu (európska patentová prihláška č. 36 776). Získa alebo navrhne sa derivát, ktorý medzi trp promotórom a Tet<sup>R</sup> génom obsahuje jediné miesta XbaI a Hind III.

Vhodnými východiskovými vektormi tohto typu sú buď pLTrpI (Gray a spol.: Nature 312, 721 až 724 (1984)), alebo pTrpETA (Gray a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 2645 až 2649 (1984)), aj keď môžu byť z pBR322, trp promotóra a akýchkoľvek žiaducich syntetických linkerov skonštruované aj iné vektory. Tak pBR322, ako aj plazmidy obsahujúce trp promotór sú verejne dostupné. Časť vybraného vektora pBR322 môže mať deletovaný segment Ava I - Pvu II od páru nukleotidov 1424 do 2065, čo je v názve plazmidov označené „XAP“. Hociktorý z predchádzajúcich plazmidov sa rozštiepi súčasným pôsobením Xba I a Hind III. Izoluje sa veľký vektorový fragment. Tento fragment sa spolu s fragmentmi B a C liguje T4 DNA ligázou. Ligačná zmes sa použije na transformáciu *E. coli* 294 (ATCC 31 446). Vyberú sa kolónie, ktoré sú rezistentné na ampicilín. Izoluje sa plazmidová DNA. Plazmidová DNA sa charakterizuje mapovaním reštrikčnými endonukleázami a sekvenovaním. Izoluje sa tak plazmid pTrpXAPTNF, ktorý obsahuje inzerty B a C.

#### Príklad 18

Expresia nádorového nekrotického faktora v *E. coli*

*E. coli* ATCC 31 446, ktorý bol transformovaný pTNFtrp, sa kultivuje v médiu M9, ktoré obsahuje 20 µg/ml ampicilínu. Kultúra sa nechá rásť do  $A_{550} = 0,3$ . Pridá sa indolyloctová kyselina na konečnú koncentráciu 20 µg/ml a kultúra sa nechá rásť do  $A_{550} = 1,10$  ml buniek sa skoncentruje a resuspenduje v soľnom roztoku pufrovanom fosforečnanom. Bunky sa sonikujú. Sonikované bunky sa zriedia pre stanovenie nádorového nekrotického faktora podľa testu z príkladu 1. Získa sa tak približne  $10^5$  jednotiek aktivity na mililiter kultúry. Táto účinnosť sa neutralizuje preinkubáciou s králičím protisérom z králikov imunizovaných proti ľudskému nádorovému nekrotickému faktoru.

#### Príklad 19

Expresia nádorového nekrotického faktora v *E. coli*

Tento spôsob je výhodnejší ako spôsob, ktorý je uvedený v príklade 18. Hostiteľom na použitie uvedených vektorov je výhodne nereverzibilný kmeň tonA *E. coli*. Takéto kmene sú rezistentné na bakteriofágy. Sú teda omnoho výhodnejšie pre kultiváciu vo veľkom meradle ako kmene divoké. Nasleduje opis vhodného spôsobu získania takýchto kmeňov. *E. coli* W3110 sa transdukuje  $\lambda$  :: Tn10, bakteriofágom  $\lambda$ , ktorý obsahuje transponovateľný element Tn10. Vznikne tak Tn10 „hop pool“ *E. coli* W3110 (N. Klecker a spol.: J. Mol. Biol. 116, 125(1977)).

*E. coli* W3110 :: Tn10 „hop pool“ sa kultivuje v kultivačnom médiu L pri teplote 37 °C do bunkovej hustoty asi  $1 \cdot 10^9$  v mililitri. Pol mililitra tejto kultúry sa odstredí, peleta sa suspenduje v 0,2 ml lyzátu  $\lambda$  phi80 (alebo T1), ktorý obsahuje  $7,0 \cdot 10^9$  jednotiek tvoriacich plak. Fág sa nechá adsorbovať 30 minút pri 37 °C. Táto suspenzia sa potom rozstrieľa na dosky EMB s tetracyklínom: 15 µg/ml. Po inkubácii počas noci sa bledoružové kolónie preniesú do 3 ml kultivačného média L, nechajú sa rásť počas noci pri 37 °C, dvakrát sa premyjú a resuspendujú sa v kultivačnom médiu L. Táto kultúra sa infektuje bakteriofágom Pl kc a fágový lyzát sa izoluje (J. Miller: „Experiment in Molecular Biology“, Cold Spring Harbor Laboratory, strana 304, 1972).

*E. coli* AT 982 (č. 4546, *E. coli* Genetic Stock Center, New Haven, Conn., USA) sa týmto spôsobom účinkom lyzátu Pl kc transdukuje na tetracyklínovú rezistenciu. Selekcia transformantov sa robí na doskách s kultivačným médiom L doplneným o tetracyklín (15 µg/ml) a dap (diaminopimelová kyselina, 40 µg/ml). Výsledné transduktanty sa testujú na tetracyklínovú rezistenciu a regeneráciu dap génu (dap<sup>+</sup>, tet<sup>R</sup>). Transduktanty dap<sup>+</sup>, tet<sup>R</sup> sa potom testujú na rezistenciu phi80 (alebo T1).

Z niekoľkých dap<sup>+</sup>, tet<sup>R</sup>, phi80 (alebo T1) rezistentných kmeňov sa pripravujú Pl kc lyzáty. Tieto lyzáty sa použijú na transdukovanie *E. coli* W3110 na tetracyklínovú rezistenciu. Transduktanty sa testujú a vyberú sa tie, ktoré sú rezistentné na phi80 (alebo T1).

Z transduktantov W3110 fhuA:Tn10- phi80R sa vyberú tie izoláty, ktoré sú citlivé na tetracyklín (S. Naloy a spol.: J. Bact. 145, 1110 (1981)). Po prečistení cez jednotlivé kolónie sa skontroluje rezistencia týchto izolátov na fág phi80 a citlivosť na tetracyklín.

Z niekoľkých mutantov, ktoré sú citlivé na tetracyklín a rezistentné na fág phi80, sa izoluje DNA. DNA sa rozštiepi pôsobením SstII. DNA rozštiepená SstII sa charakterizuje Southernovým blotovacím postupom s použitím rádioaktívne označenej a pôsobením SstII rozštiepenej ::Tn10 DNA ako sondy. Zistí sa tak, či došlo k excízii Tn10 (R. Davis a spol.: „Advanced Bacterial Genetics“, Cold Spring Harbor Laboratory, 1980). Jeden z izolátov citlivých na tetracyklín má stratu dvoch Tn10 hybridizačných pásov pri porovnaní s hybridizáciou DNA z :: Tn10 a W3110 fhuA : Tn10 phi80R. Tretí hybridizačný pás má zmenenú pohyblivosť, čo znamená, že došlo k delícii spôsobenej nepresným resekovaním Tn10.

SDS-gélová elektroforéza vonkajšieho membránového preparátu z kmeňa s nepresným resekovaním Tn10 ukázala, že pás, o ktorom sa predpokladá, že je proteín fhuA, má zmenenú elektroforetickú pohyblivosť pri porovnaní s divokým typom proteínu fhuA. Výsledný proteín nie je funkčný ako receptorový proteín fagu  $\lambda$  phi80. Druhý nezávislý kmeň, ktorý má taktiež nepresné resekovanie Tn10, nemá na géli SDA žiadny proteín fhuA.

Žiadny z týchto kmeňov nemá reverziu rezistencie na tetracyklín alebo citlivosť na  $\lambda$  phi80, čo ukazuje na existenciu nepresného resekovania celého alebo časti transpozónu Tn10 spoločne s buď čiastočnou alebo úplnou deléciou génu fhuA. Jeden z takýchto kmeňov W3110 (NL106) sa výhodne používa ako hostiteľ pre tu opísané vektory kódujúce nekrotický nádorový faktor.



NL106 sa transformuje ptpXAPTNF a naočkuje sa do 10 litrov média s pH 7,4 ktoré má nasledujúce zloženie.

zložka	gramov v litre
síran amónny	5,0
hydrogénfosforečnan draselný	6,0
dihydrogénfosforečnan sodný	3,0
citran sodný	1,0
L-tryptofán	0,2
NZ amín AS	4,0
kvasnicový extrakt	4,0
síran horečnatý	1,2
glukóza	25,0

zložka	obsah
roztok so stopovými prvkami (ióny Fe, Zn, Co, Mo, Cu, B a Mn)	0,5 ml
tetracyklín	1,0 mg

Ku kultúre sa pridáva glukóza rýchlosťou 1g/min., len čo  $A_{550}$  kultúry dosiahne asi 20. Fermetrácia sa robí pri 37 °C pokiaľ  $A_{550}$  nedosiahne 136 (asi 20 hodín). Odstredovaním kultúry sa získa bunková pasta. Potom sa táto pasta 30 minút extrahuje pri pH 8,0 a za teploty miestnosti pufrom, ktorý obsahuje 1000 nM tris, 10 mM ctyldiaminotetraoctovú kyselinu, 1000 mM chlorid sodný, 2000 nM močovinu a 0,1%  $\beta$ -merkaptotanol. Extrakt sa zriedi a testuje ako je uvedené v príklade 1. V tomto teste bolo zistené, že ekvivalent 1 mg nádorového nekrotického faktora je  $1.10^8$  jednotiek aktivity nádorového nekrotického faktora. Z jedného litra kultúry sa získajú až asi 2 gramy nádorového nekrotického faktora. Sekvenovanie na aminovom konci ukazuje, že asi od 75 do 86 hmotnostných % je (maturovaný) nádorový nekrotický faktor s valylovou skupinou na aminovom konci, zvyšná časť je met-nádorový nekrotický faktor. Navyše, okrem vysokých hladín exprese, proteín nie je prítomný v refraktálnych telesách ani nie je toxický pre bunky, ako bolo preukázané získanými extrémne vysokými bunkovými hustotami.

#### Príklad 20

Konštrukcia a expresia génu mutantného nádorového nekrotického faktora

V tomto príklade sa opakujú príklady 17 až 18 s tým, že oligonukleotidový fragment B sa syntetizuje s histidínovým kodónom CAT miesto arginínového 6 kodónu CGT. Expresuje sa mutantný nádorový nekrotický faktor.

#### Príklad 21

Konštrukcia a expresia iného génu mutantného nádorového nekrotického faktora

V tomto príklade sa opakuje postup z príkladov 17 až 18 s oligonukleotidovým fragmentom B kódujúcom leucín (CTT) namiesto zvyšku 2 arginínového kodónu. V prvých pokusoch sa získa asi 1200 mg aktivity maturovaného nádorového nekrotického faktora na liter kultúry. V kultúre nebol detekovaný neprocesovaný nádorový nekrotický faktor.

#### Príklad 22

Konštrukcia vektora kódujúceho spojenie nádorového nekrotického faktora so sekvenciou sekrečného signálu

Sekvenciu *E. coli* tepelne stabilného entorotoxínového génu ATII opisuje Picken a spol.: Infection and Immunity 42(1), 269 až 275 (1983). V tomto príklade sa liguje fragment obsahujúci sekrečný signál STII a Shine-Dalgarno sekvencie po vlákne promótoru *E. coli* alkalickéj fosfatázy. Po signáli STII v smere 3' nasleduje syntetický oligonukle-

otid, ktorý obsahuje kodóny iniciačných siedmich aminokyselín nádorového nekrotického faktora na aminovom konci a zvyšok kódujúcej sekvencie nádorového nekrotického faktora. Všetky predchádzajúce časti sa umiestnia do vektora pBR322.

Plazmid pWM501 (Picken s spol.: Infection and Immunity 42(1), 269 až 275 (1983)) obsahuje gén STII. pWM501 sa rozštiepi pôsobením XbaI a NsiI. Izoluje sa fragment s približne 90 párami nukleotidov. Tento fragment by sa mohol syntetizovať taktiež organicky spôsobmi známymi odborníkom (fragment A).

Plazmid pBR322-Trp, ktorý je opísaný v príklade 17 (p20kLT), sa rozštiepi pôsobením XbaI a HindIII. Izoluje sa veľký vektorový fragment (fragment B). Tento fragment obsahuje začiatok replikácie *E. coli* a gén prepožičiavajúci fenotypu ampicilínovej rezistencie.

Syntetický oligonukleotid sa syntetizuje ako dve vlákna. Apeláciou sa získa nasledujúca štruktúra (sú uvedené taktiež prečnievajúce konce reštrikčných miest a aminokyseliny kódované oligonukleotidmi).

```

                    VAL ARG SER SER SER ARG THR
5'          GRA CGT TCT TCT TCT CGT ACT          3'
   ACGT CAT ACG AGA AGA AGA GCA TGA GGCT
   NsiI                                     Aval

```

Táto štruktúra je označená ako fragment C.

Plazmid pTNFtrp z príkladu 18 sa rozštiepi pôsobením Aval a HindIII. Izoluje sa fragment Aval - HindIII (fragment D) s 578 párami nukleotidov. Tento fragment obsahuje všetky kódujúce sekvencie nádorového nekrotického faktora okrem siedmich aminokyselín.

Sekvencia DNA, ktorá obsahuje promótor *E. coli* alkalickéj fosfatázy (AP) napojený na heterolognú Shine-Dalgarno (S. D) sekvenciu (trp) a ktorá má konce EcoRI a XbaI, sa skonštruuje nasledujúcim spôsobom. Fragment DNA, ktorý obsahuje časť promótoru AP, sa izoluje z plazmidu pHI-1 (H. Inouye a spol.: J. Bacteriol. 146, 668 až 675 (1981)), aj keď je možné použiť akékoľvek príslušné zdroje obsahujúce promótor AP DNA. Plazmid pHI-1 sa rozštiepi pôsobením HpaI za vzniku otvoreného plazmidu. Syntetický EcoRI linker GAATTCGAATTCCTTAAGCTTAAG sa liguje s plazmidom.

Naviazaný plazmid sa rozštiepi nadbytkom EcoRI a nedostatkom RsaI, čím sa rozštiepia všetky miesta EcoRI a časť miest RsaI. Tieto dva stupne, t. j. štiepenie pôsobením EcoRI a pôsobením RsaI je lepšie vykonať postupne ako súčasne. Z tohto EcoRI-RsaI štiepenia sa izoluje fragment so 420 párami nukleotidov, ktorý obsahuje promótor AP.

Sekvencia trp S. D. sa získa nasledujúcim spôsobom. Plazmid alebo organizmus, ktorý obsahuje trp promótor (pIFN-beta 2, D. Leung a spol.: Biotechnology 2, 458 až 464 (1984)), sa rozštiepi pôsobením XbaI a RsaI. Izoluje sa fragment s 30 párami nukleotidov, ktorý obsahuje trp S. D. sekvenciu. Tento fragment sa liguje s promótorovým fragmentom AP so 420 párami nukleotidov. Získa sa fragment E (fragment EcoRI-XbaI) so 450 párami nukleotidov. Fragment E má sekvenciu nukleotidov:

#### EcoRI

```

GAATTCAACTTCTGCATACCTTTGGATTAAGGAAATGAGAGAGTGAAGAAATGCTATTCCT
GAGTTGTTATTTAAAGCTTGGCCAAAAGAAAGAGTCCGAAAAGAAATGGTGGGAGGAT
AGAACTTTGGAGATTATGCTGTAAGTGAATGCTTGGGAAATAGCCGCAAAATGACCAA
CACCGGTTGATTGATCAGCTAGAGGGGGGCTGTATCGAAGTAAAGCCGATGCCAGCA
TTCTCGACGACGATACGGAGGTGTGCTGGCGAATTAAGTAAAGAAATTTGAAAGCATCC
TCGTCAGTAAAGATTTAATCTTTTGAAGAGTGTGATAAAGTTGTCGACGGGGGAGACTT
ATAGTCCGTTTGTGTTTTTTTTTAAATGATATTTGTCAGCAAAGTGTGAGGTAA
AAGGATATCTAGA

```

trpS.D. XbaI

Fragmenty A, B, C a D sa ligujú štvorstupňovou ligáciou. Ligačná zmes sa použije na transformáciu *E. coli* 294. Transformanty sa identifikujú kultiváciou na doskách LB obsahujúcich ampicilín. Z kolónie transformantov sa izoluje plazmid trpSTIITNF. Tento plazmid sa rozštiepi pôsobením XbaI a EcoRI. Odstráni sa tak trp promótor. Zvyšok plazmidu sa liguje s fragmentom E (fragment EcoRI-XbaI) so 450 párami nukleotidov, ktorý obsahuje *E. coli* promótor alkalickéj fosfatázy. Výsledný plazmid sa nazýva pAPAS-TIITNF.

#### Príklad 23

Expresia a spôsob napojenia nádorového nekrotického faktora so sekvenciou sekrečného signálu

*E. coli* sa transfektuje plazmidom pAPSTIITNF a potom sa naočkuje do 10 litrov média (pH 7,0) s nasledujúcim zložením:

zložky	gramov na liter
síran amónny	5,0
hydrogénfosforečnan draselný	2,6
dihydrogénfosforečnan sodný	1,3
citran sodný	1,0
chlorid draselný	1,5
NZ amín AS	5,0
kvasnicový extrakt	2,0
síran horečnatý	1,2
glukóza	25,0
roztok so stopovými prvkami (ióny Fe, Zn, Co, Mo, Cu, B a Mn)	0,5 ml
ampicilín	20,0 mg

Kultivácia sa robí rovnakým spôsobom ako je opísané v príklade 19 až na to, že sa kultivácia robí pokiaľ  $A_{550}$  nedosiahne 140. V tomto okamihu obsahuje kultúra asi 400 mg nádorového nekrotického faktora v jednom litri kultúry. Podľa elektroforézy na géloch sa asi 70 až 80 hmotn. % tohto množstva získa ako maturovaný proteín. Extrakciu buniek spôsobom podľa príkladu 19 (využitím osmotického šoku buniek) sa získa približne tá istá aktivita nádorového nekrotického faktora ako pri extrakcii celých buniek.

#### Príklad 24

Konstruktia a expresia derivátov nádorového nekrotického faktora

Mutantné deriváty sekvencie aminokyselín nádorového nekrotického faktora na obrázku 10 sa pripravujú tak, aby uspokojili aspoň jeden alebo viac z nasledujúcich požiadaviek: zvýšenie cytolytickej účinnosti, zvýšenie čistej diferenciálnej cytolytickej účinnosti na nádorové bunky versus normálne bunky, príprava imunogénov nádorového nekrotického faktora na získanie protilátok proti nádorovému nekrotickému faktoru pre diagnostické použitie, príprava unikátnych miest pre kovalentnú modifikáciu (napríklad vtedy, keď enzýmové označenia sú kovalentne naviazané pri príprave diagnostických činidiel EMIT alebo ELISA) a zmena fyzikálnych vlastností nádorového nekrotického faktora, napr. jeho pohyblivosti, pI a podobných. Stanovenie žiadanej účinnosti vybraných derivátov sa robí rutinným testovaním vhodnými testami známymi odborníkom.

Nádorový nekrotický faktor a jeho deriváty výhodne nezahŕňajú tie nádorové nekrotické faktory, ktorých sekvencie zodpovedajú sekvenciám neprimátov. Nádorový nekrotický faktor a jeho deriváty výhodne nemajú ani aminový koniec nádorového nekrotického faktora neprimátov, napr. aminový koniec desValArg, ktorý je charakteristický

pre králičí nádorový nekrotický faktor, ani aminový koniec génu nádorového nekrotického faktora, ktorý má sekvenciu Val-Arg-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-Ser-Val-Ala-Asn-Pro-Aln-Ala-Glu-Gly- (Wang a spol.: Science 228, 149 až 154 (1985)).

Nasledujúci spôsob je všeobecne aplikovateľný (podľa J. Adelmána a spol.: DNA 2(3), 183 až 193) na konštrukciu a expresiu sekvencií DNA akéhokoľvek mutantného nádorového nekrotického faktora, ktoré obsahujú tiché mutácie alebo ktoré kódujú mutantný nádorový nekrotický faktor. Na ilustráciu sú tu uvedené reprezentatívne deriváty: Arg 32 je zmenený na histidylovú skupinu (substitúcia), His 73 je vynechaný (delečná mutácia) a na Leu 157 je napojená leucylová skupina (došlo teda k inzercii). Tomu je však nutné rozumieť tak, že rovnakým spôsobom sa získavajú ďalšie typy mutantov.

Odborníkom sú známe ďalšie spôsoby, ktoré sú vhodné na tvorbu tichých alebo expresovaných mutácií v DNA kódujúcej nádorový nekrotický faktor. Napríklad, mutantná DNA sa skonštruuje tak, že sa jednoducho chemicky syntetizuje úplná sekvencia alebo sa syntetizuje časť sekvencie a fragment sa liguje so zvyškom DNA. Chemická syntéza DNA je výhodná vtedy, ak si odborník želá pripraviť mutant priamo bez získania DNA kódujúcej nádorový nekrotický faktor z nádorových zdrojov. Obyčajne však východisková DNA kóduje prírodnú sekvenciu aminokyselín, vrátane ich alelických variantov. Je potom žiaduce pripraviť z nich isté mutantné deriváty.

Pri príprave DNA kódujúcej mutantné deriváty nádorového nekrotického faktora je žiaduce, aby nedošlo k zmenám kodónov, ktoré by umožnili, aby mRNA z nich transkribovaná tvorila silné štruktúry so spárovanými a nespárovanými oblasťami (stem and loop structure). Ak sa podarí vyhnúť týmto štruktúram, má to obyčajne za následok vyššie výťažky. Z rovnakého dôvodu by mali byť použité kodóny, ktoré sú výhodné pre hostiteľa transformantu.

Vhodnou východiskovou DNA je fragment EcoRI-HindIII plazmidu pTrpXAPTNF (príklad 17). Tento fragment sa získa postupným štiepením pôsobením EcoRI a Hind III, po ktorom sa izoluje fragment obsahujúci gén THF. Tento fragment zahŕňa trp promótor a štruktúrny gén pre metionylový nádorový nekrotický faktor. Na získanie jednovláknovej kópie tohto génu vhodnej pre mutagénzu sa fragment EcoRI-Hind III klonuje do polylinkerového miesta fágu M13 mp8 RF-DNA (J. Messing a spol.: Gene 19, 269 až 276 (1982)), „RF“ znamená replikatívnu formu fágu, tento fág je komerčne dostupný). Príslušný podiel rozštiepenej zmesi EcoRI-HindIII sa pridá k ligačnej reakcii, ktorá obsahuje 10 ng M13 mp8 RF-DNA, ktorý bol vopred rozštiepený pôsobením EcoRI a HindIII. Po dvojhodinovej inkubácii pri teplote miestnosti sa ligačná zmes použije na transformáciu *E. coli* JM103 (komerčne dostupný kmeň: je možné použiť taktiež kmeň JM101). Transformované bunky sa vysejú na vrchný agar obsahujúci X-GAL (dibróm-dichlór-indolyl-galaktózid) a IPTG (izopropyltio-galaktózid). Na izoláciu M13 mp8/TNF RF-DNA minitostovacím postupom (Birnboim a Doly: Nucl. Acids Res. 7, 1513 až 1523 (1980)) sa použijú bakteriálne kultúry (jeden mililiter) infikované fágom získaným z bezfarebných plakov. Výsledný rekombinantný fág M13 mp8/TNF nesie kódujúce vlákno génu nádorového nekrotického faktora.

Pre miestne riadenú mutagénzu sa syntetizujú oligodeoxyribonukleotidy (mutagénne oligoméry) so sekvenciou dopĺňajúcou 15 báz na niektorej strane mutačného miesta, ako je ukázané v nasledujúcich diagramoch. V týchto diagramoch N znamená doplnkové bázy a M znamená nukleovú kyselinu, ktorá má byť vložená, vynechaná alebo sub-

stituovaná. Inzercia alebo delécia sa obyčajne robia v skupinách po 3. Tým sa udrží gén po zmene vlákna vo fáze.

Pre deléciu:	oligomér DNA	(N) <sub>15</sub> (N) <sub>15</sub>
	vektor DNA	(N) <sub>15</sub> (M) <sub>1</sub> (N) <sub>15</sub>
Pre substitúciu:	oligomér DNA	(N) <sub>15</sub> (M) <sub>1</sub> (N) <sub>15</sub>
	vektor DNA	(N) <sub>15</sub> (M <sub>2</sub> )(N) <sub>15</sub>
Pre inzerciu:	oligomér DNA	(N) <sub>15</sub> (M) <sub>1</sub> (N) <sub>15</sub>
	vektor DNA	(N) <sub>15</sub> (N) <sub>15</sub>

M<sub>1</sub> znamená bázu alebo oligomér, ktorý nie je doplnkový k báze alebo oligoméru M<sub>2</sub>. M<sub>1</sub> tu znamená žiadanú mutantnú sekvenciu. Obyčajne sa pripravujú také oligoméry, ktoré súčasne spôsobujú viac ako jeden typ mutácie.

Oligomérom s opačným zmyslom pre mutáciu Arg-his 32 je: p CAG GAG GGC ATT GGC ATG GCG GTT CAG CCA CTG-OH.

Oligomérom s opačným zmyslom pre deléciu His 73 je: p GTG GGT GAG GAG CAC GGT GGA GGG GCA GCC-OH.

Oligomérom s opačným zmyslom pre inzerciu Leu 158 je: p TGT TCG TCC TCC TCA AAG CAG GGC AAT GAT CCC-OH.

Tieto priméry sa syntetizujú konvenčnými spôsobmi. Na použitie pri mutagenéze sa 10 pmólov oligomérov alebo lac priméru 5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3' fosforyluje 30 minút pri 37 °C v 10 µl 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 mM EDTA, 10 mM chloridu horečnatého, 10 mM ditiotritolu a 0,1 mM ATP obsahujúcich dve jednotky T4 polynukleotid kinázy. Na použitie ako sonda (pozri nižšie) sa 2 pmóly syntetických oligonukleotidov fosforylujú ako je uvedené až na to, že sa namiesto 0,1 mM ATP použije 1 µM  $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP (Amersham). Špecifická aktivita je bežne vyššia ako 5.10<sup>9</sup> impulzov za minútu na pikomól oligonukleotidového reťazca.

Hybridizácia tak oligoméru, ako lac priméru na jednovláknové DNA z fágu M13 mp8/TNF nasledovaná zväčšením priméru vedie k tvorbe čiastočne heteroduplexných DNA, ktorých jedno vlákno obsahuje mutantnú DNA.

Pri čiastočnej tvorbe heteroduplexu sa jednovláknová M13 mp8 TNF DNA (300 ng) zahrieva na 80 °C (dve minúty), 50 °C (päť minút) a pri teplote miestnosti (päť minút) v 20 µl 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,1 mM EDTA a 50 mM chloridu sodného obsahujúcich 1 pikomól fosforylovaného oligoméru alebo priméru (pridané ako rovnaké podiely z kinázovej reakcie). Zväčšenie priméru začína pridaním 30 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,1 mM EDTA, 12 mM chloridu horečnatého, 10 mM ditiotritolu, 0,7 mM dATP, 0,2 mM dGTP, 0,2 mM DTTP a 0,2 mM dCTP obsahujúcich 2 jednotky *E. coli* DNA polymerázy I, veľký fragment a 20 jednotiek T4 DNA ligázy. Po 30 minútach pri teplote miestnosti sa reakčná zmes inkubuje štyri hodiny pri 37 °C a potom pri 4 °C počas noci. Rovnaké podiely sa extrahujú fenolom. DNA sa vyzráža etanolom a rozpustí v 15 µl vody. DNA v týchto prípadoch sa použije na transformáciu *E. coli* JM103.

lac primer hybridizuje fág v mieste 5' na oligomér. Predĺžením priméru sa stabilizuje heteroduplexová štruktúra. Oligomér a primér sa enzymaticky fosforylujú, čím umožnia spojujúce reťazce DNA T4 DNA ligáze.

Fenolom extrahovaná duplexová DNA z podielu C (10 µl) sa pridá k 10 µl 0,06 M octanu sodného s pH 4,5, 0,6 M chloridu sodného a 0,6 mM chloridu zinočnatého obsahujúcich 200 jednotiek S<sub>1</sub> nukleázy. Po päťminútovej inkubácii pri 37 °C sa pridá 5 µg kvasnicovej tRNA. Extrakciou fenolom a vyzrážaním etanolom sa izolujú nukleové kyseliny. 30 ng jednovláknovej M13 mp8 DNA (asi 10 000 jednotiek tvoriacich plak) s použitím rovnakých S<sub>1</sub> podmienok poskytnete menej ako 100 plakov v teste transformácie

DNA, pričom rovnaké množstvo RF-DNA si zachová viac ako 80 % svojich transformačných možností. DNA, na ktorú bolo pôsobené S<sub>1</sub>, sa použije na transformáciu *E. coli* JM103. Výsledný fág sa analyzuje in situ testovaním plakov.

Bakteriálne dosky (s priemerom 15 cm), ktoré obsahujú niekoľko sto plakov rekombinantného fágu M13 sa testujú in situ hybridizáciou plakov (Benton a spol.: Science 196, 180 až 182 (1977)) na pôvodný i mutogénny genotyp pomocou príslušných značených oligomérov na oddelených súpravách filtrov (asi 10<sup>6</sup> impulzov za minútu na filter). Hybridizácia sa robí počas noci pri 50 °C v 40 % formamide, 5 x SSC. Filtre sa premyjú pri 45 °C, 2 x SSC, 0,02 % dodecylsulfátom sodným, vysušia na vzduchu a exponujú na röntgenový film pri -70 °C s kontrastným filtrom.

Aby sa oddelila hybridizácia oligomérov k mutantnému DNA vláknu (úplný doplnok) od hybridizácie k východiskovej DNA je nutné zmeniť selektivitu hybridizačného procesu (zmenou koncentrácie SSC). Každý mutant má inú schopnosť hybridizácie podľa povahy a počtu substituovaných, vynechaných alebo vložených báz. Napríklad, ak sa má stanoviť mutácia jedinej bázy, teda mutácie malej, sú potrebné vysokoselektívne podmienky, aby sa mohla rozlíšiť mutovaná DNA od pôvodnej nemutovanej DNA. Napr. pri delícii kodónu alebo substitúcii 1 až 3 báz by mala hybridizovaná sonda byť menšia ako mutujúci sa oligomér. Takouto typickou sondou je sonda asi 14 až 20 báz. Úloha vyhľadávania mutantných delécií je uľahčena tým, ak sa na testovanie straty sekvencie použije sonda, ktorá obsahuje alebo tvorí delegovanú sekvenciu. Ak táto sonda nehybridizuje DNA z vybraného plaku, je možné z toho vyvodiť, že došlo k žiadanej strate cieľovej sekvencie.

Vyberie sa plak, ktorý sa hybridizuje značeným oligomérom a naočkuje sa do *E. coli* JM103. Zo supernatantu sa pripraví jednovláknová (ss)DNA. Z bunkových peliet sa pripraví dvojitá vlákna (ds)DNA. ssDNA sa použije ako templát pre dideoxy-sekvenáciu klonu využitím doplnkových sekvencií M13 univerzálneho priméru alebo syntetického oligoméru v 3' mieste mutovanej sekvencie DNA nádorového nekrotického faktora. Dideoxy-sekvenovanie potvrdzuje, že izolovaný plak obsahuje mutovanú DNA. Tento fág sa označí M13 mp8/TNFmtnt.

Fág M13 mp8/TNFmtnt sa rozštiepi pôsobením EcoRI a Hind III. Izoluje sa fragment, ktorý kóduje nádorový nekrotický faktor. Pôsobením EcoRI a Hind III sa rozštiepi pTrpXAPTNF. Izoluje sa vektorový fragment. Mutantný fragment sa potom liguje do vektorového fragmentu. Ligačná zmes sa transformuje *E. coli* W3110, NL106 alebo 294 (ATCC 31 446). Spôsobom podľa príkladov 18 alebo 19 sa izoluje mutantný nádorový nekrotický faktor. Ďalšie informácie, ktoré sa týkajú M13 mutácie, je možné získať z GB patentovej prihlášky 2 130 219A.

Mutanty, ktoré sa pripravujú podľa tohto spôsobu, sa delia do troch tried: substitúcie, delécie a inzercie. Delenie v týchto triedach je uvedené v nasledujúcej tabuľke. Pokiaľ nie je uvedené inak, ide o mutanty maturovaného nádorového nekrotického faktora z obrázka 10.

typ mutantu	miesto na nádorovom nekrotickom faktore	reprezentatívna modifikácia na označenom mieste
-------------	---	---

#### A. Substitúcie

##### 1. Modifikácie, ktoré sa týkajú stupňa alebo povahy náboja

1.	arg 6	his
2.	lys 65	arg
3.	pro 20	arg
4.	asp 10	his
5.	glu 53	thr
6.	pln 47	asp

7.	asp 45	gln alebo asu
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.	gln149	lys
23.	leu120	lys

typ mutantu	miesto na nádorovom nekrotickom faktore	reprezentatívna modifikácia na označenom mieste
-------------	---	---

### II. Modifikácie, ktoré sa týkajú hydrofilného alebo hydrofóbného charakteru

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. Sterické modifikácie (zmeny v objemnosti vedľajšieho reťazca)

1.	leu 63	phe
2.	ser 52	tyr
3.	ile 58	leu
4.	gly 40	ile
5.	val 13	phe
6.	leu 120	phe
7.	ile 146	gly
8.	asn 137	glu
9.	ile 154	phe
10.	ile 155	gly
11.	phe 144	ile

### B. Inzercie

1.	po leu 157	gly gly-COOH
2.	medzi Asp 10 a Lys 11	his
3.	medzi ile 58 a tyr 59	leu
4.	medzi Ser 60 a gln 61	lys
5.	medzi arg 31 a arg 32	ala
6.	medzi gly 121 gly 122	gly
7.	pred val I	imunogénny polypeptid
8.	po leu 157	imunogénny polypeptid
9.	medzi gln 149 a val 150	gly gly
10.	medzi ala-1 a val pre-nádorového nekrotického faktora	lys arg

### C. Delécie

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

### D. Kombinácie

1.	ile 58	leu
	leu 57	phe
2.	gln 149	delécia
	tyr	phe
3.	lys 112	delécia
	glu 115	lys
4.	val 1	thr
	ala 22	lys
	gly 24	asn
	ala 33	asp
5.	tyr 115	phe
	glu 116	lys
6.	inzercia gly medzi gly 121 a gly 122	
	pridanie gly gly-COOH po leu 157	
7.	delécia val 1 až gly 66 a substitúcia NH <sub>2</sub> -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-	
8.	delécia ala 111	
	ala 109	gln
	leu 120	his
9.	asn 19	gln
	asn 92	gln
	asn 137	gln

Za povšimnutie stoja mutácie, v ktorých sú miesta arg 2, arg 6 (pozri príklady 20 a 21), arg 32 a arg 131, kde dochádza k hydrolyze trypsínom, vynechané alebo pozmenené tak, že potom nie sú citlivé na trypsín. To by mohlo predĺžiť polčas života nádorového nekrotického faktora in vivo, pričom sa zníži možnosť fermentačného odštiepenia. Miesta arg 2 a arg 6 nie sú rozhodujúce pre biologickú účinnosť, pretože táto zostane zachovaná aj keď sa obidve tieto oblasti odstránia. Ale štiepením v miestach arg 32 a arg 131 sa účinnosť stratí. Preto je žiaduce, aby arg 32 a/alebo arg 131 boli substituované histidinylovou skupinou alebo, menej výhodné, skupinou gln. Tým sa odstráni alebo zníži vnímavosť miesta na enzým, ale zostane zachovaná bazicita postranného reťazca. Z rovnakého dôvodu sa arg 31 substituuje histidinylovou skupinou alebo, menej výhodne, glutamínom. Miesta, v ktorých dochádza k hydrolyze pôsobením enzýmu, sú vložené taktiež medzi napojenia polypeptidov a sekvenciou TNF, lebo takto sa získajú miesta, ktoré sú predurčené na uvoľnenie maturovaného alebo mutovaného nádorového nekrotického faktora. Alebo sú takými miestami substituované skupiny v leader sekvencii pre-nádorového nekrotického faktora. Predpokladá sa, že substitúcia asn za asp 45 a expresia v hostiteľskej bunke (napríklad kvasinkovej alebo cicavčej), ktorá je schopná glykozylácie, vedie ku glykozylovanému nádorovému nekrotickému faktoru.

## Príklad 25

Expresia nádorového nekrotického faktora v kvasinkách za regulácie ADH promótorom

Podľa postupu opísaného v príklade 17 sa skonštruuje plazmid TrpXAPTNF až na to, že p20KLT alebo ptpETA (alebo plazmid pBR322) sa rozštiepi skôr pôsobením EcoRI a Hind III ako Xba I a Hind III, a že sa syntetický fragment B pripraví skôr s EcoRI kohezívnym zakončením ako s Xba I kohezívnym zakončením. Ligačná zmes sa potom použije na transformáciu *E. coli* ATCC 31 446. Reštrikčnou analýzou sa identifikuje plazmid pTNFRI, ktorý obsahuje DNA kódujúcu nádorový nekrotický faktor naviazanú EcoRI miestami. Plazmid pTNFRI sa izoluje, rozštiepi sa pôsobením EcoRI a izoluje sa fragment T-1, ktorý obsahuje DNA nádorového nekrotického faktora.

Plazmid pFRPn (európsky patent č. 60 057A) sa rozštiepi pôsobením EcoRI. Na zabránenie recirkulácie sa na rozštiepený plazmid pôsobí alkalickou fosfatázou, pomocou T4 DNA ligázy sa liguje na fragment T1 nádorového nekrotického faktora. Ligačná zmes sa použije na transformáciu *E. coli* ATCC 31 446. Kolónie, ktoré sú rezistentné na ampicilín, poskytujú dve série plazmidov s opačnými orientáciami inzerty T-1, ako bolo stanovené reštrikčnou analýzou elektroforézou na agarózových géloch. Plazmidy z *E. coli* transformantov sa vyčistia a použijú na transformáciu kvasiniek, ktoré majú trpl mutáciu (napríklad kvasinkový kmeň RH218, neobmedzene uložený v ATCC č. 44 076), na  $trp^+$  fenotyp. Bolo zistené, že plazmidy orientované tak, že začiatkový kodón segmentu T-1 je umiestnený vedľa fragmentu promótoru alkoholdehydrogenázy, transformujú kvasinky, ktoré potom expresiou poskytujú nádorový nekrotický faktor. Nádorový nekrotický faktor sa izoluje z extraktov kvasinkových transformantov. Stabilita plazmidu pri fermentáciách vo väčšom meradle sa zlepší tým, že sa používa expresný plazmid obsahujúci dvojmikrónový začiatok replikácie namiesto pFRPn chromozomálneho začiatku replikácie (ars 1) a že sa používa zlúčiteľný hostiteľský kmeň (*J. Beggs. Nature* 275, 104 až 109 (1978)).

## Príklad 26

Expresia nádorového nekrotického faktora v cicavčích bunkách

Plazmid pEHER (európsky patent č. 117 060 A) sa rozštiepi pôsobením EcoRI. Na rozštiepený plazmid sa pôsobí teľacou črevnou alkalickou fosfatázou a potom sa liguje do fragmentu T-1 z príkladu 25. Ligačná zmes sa použije na transformáciu *E. coli* ATCC 31 446. Izolujú sa dva plazmidy (označené pHERTHF I a pHERTNF II), ktoré obsahujú DNA nádorového nekrotického faktora s opačnými orientáciami ako bolo stanovené reštrikčnou analýzou na polyakrylamidových géloch. Tieto plazmidy sa použijú na transfektovanie a selekciu buniek CHO DHFR-DUX-B11, CHO I a Ltk<sup>-</sup>.

Bunky pletivovej kultúry sa transfektujú zmiešaním pripraveného 1 µg pHERTNF I alebo pHERTNF II s 10 µg krysej DNA v objeme 250 µl, 0,25M CaCl<sub>2</sub>, potom sa prikvapká 250 µl pufrovaného soľného roztoku HEPES (280 nM chlorid sodný, 1,5 mM hydrogénfosforečnan sodný, 50 mM HEPES, pH 7,1). Po 30 minútach pri teplote miestnosti sa roztok pridá k bunkám pletivovej kultúry, ktoré sa kultivujú v 60mm plastických miskách pre pletivové kultúry. Používajú sa bunky CHO I, CHO DHFR-DUX-B11 a Ltk<sup>-</sup>. Misky obsahujú 3 ml kultivačného média zodpovedajúce hostiteľskej bunke.

Pre bunky CHO I a CHO DHFR-DUX-B11 sa ako médium použije médium Ham F-12 (Gibco) doplnené 10 % telefacieho séra, 100 µg/ml penicilínu, 100 µg/ml streptomy-

cínu a 2nM L-glutaminu. Pre bunkovú líniu Ltk<sup>-</sup> sa použije Dulbecom modifikované Eaglové médium (DMEM) doplnené ako je uvedené.

Po 3 až 16 hodinách sa médium odstráni a bunky sa premyjú 20 % glycerolom v soľnom roztoku pufrovanom fosforečnanom. Na každú dosku sa pridá čerstvé médium a bunky sa inkubujú ďalšie dva dni.

Transfektované hostiteľské bunky sa vyberú trypsinizáciou buniek po 2 dňoch kultivácie (trypsinizácia znamená, že sa na bunky pôsobí 0,5 mg/ml sterilným trypsinom, ktorý obsahuje 0,2 mg/ml etyléndiaminotetraoctovej kyseliny). Asi 3.10<sup>5</sup> buniek sa pridá k 10 mm doskám s pletivovou kultúrou so selektívnym médiom. Pre bunky DHFR<sup>-</sup> sa pripraví médium (F-12 Gibco) bez glycínu, hypoxantínu a tymidínu (GHT<sup>-</sup> médium). Pre hostiteľské bunky DHFR<sup>+</sup> sa k normálnemu kultivačnému médiu pridáva metotrexát (100 až 1000 nM). Kontroly sa robia za transfekčných podmienok bez plazmidu alebo s plazmidom pFD-11 (európsky patent č. 117 060A), ktorý obsahuje normálnu DHFR. Kolónie, ktoré vzniknú z buniek expresujúcich DHFR plazmid, sú zrejmé počas 1 až 2 týždňov. Identifikujú sa transformanty, ktoré expresujú nádorový nekrotický faktor.

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Spôsob izolácie ľudského nádoru nekrotizujúceho faktora (TNF) z heterogénnej zmesi s obsahom iných proteínov, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že pozostáva z týchto krokov:

- aplikácia kompozície na najmenej jeden silikát, sklo s kontrolovanou veľkosťou pórov, alkyl sefárou alebo častice živice s vlastnosťou aniónového meniča s jednotnou veľkosťou, na absorpciu ľudského TNF a  
- elúcia adsorbovaného ľudského TNF.

2. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že ľudský TNF je eluovaný etylénglykolom.

3. Spôsob podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c i s a t ý m**, že anión meničovou živicom je kvartérna amino-substituovaná polystyrénová anión meničová živica.

4. Ľudský TNF, ktorý  
a) nie je glykozylovaný,  
b) má molekulovú hmotnosť asi 17 000 stanovenú pomocou SDS-PAGE,  
c) je schopný prednostnej deštrukcie alebo zastavenia rastu nádorových buniek v porovnaní s normálnymi bunkami pri rovnakých podmienkach,  
d) je úplne homogénny podľa stanovenia SDS-PAGE,  
e) obsahuje  
i) poradie aminokyselín uvedené na obr. 10 alebo  
ii) poradie zvyškov aminokyselín 35 - 66 uvedené na obr. 10, alebo  
iii) poradie zvyškov aminokyselín 110-133 uvedené na obr. 10, alebo  
iv) poradie aminokyselín Glu Thr Pro Glu Gly Ala Glu Ala Lys Pro Trp Tyr Glu Pro,  
f) má špecifickú aktivitu vyššiu ako asi 10 miliónov jednotiek/mg proteínu,  
g) je purifikovaný na stupeň dostatočný na sekvenovanie intaktného TNF alebo na trypsinovú hydrolýzu jeho fragmentu pomocou Edmanovej degradácie v sekvenátore aminokyselín vybavenom studenými zachycovačmi a použitím polybrnového nosiča.

5. Ľudský TNF podľa nároku 4, ktorý neobsahuje iné cytotoxické proteíny.

6. Ľudský TNF podľa nároku 4, ktorý neobsahuje proteín patriaci medzi lymfotokíny,  $\alpha$ -globulíny, serín proteázy a interferón.

7. Ľudský TNF podľa nároku 4, ktorý je v prímеси s fyziologicky prijateľným pufrom, aminokyselinovej alebo neiónovej povrchovo aktívnej látky alebo ich zmesi.

8. Ľudský TNF podľa nároku 4, ktorý je lyofilizovaný.

9. Zmes s obsahom ľudského TNF podľa nároku 4, ktorá obsahuje fyziologicky prijateľnú zložku z bunky nie ľudského pôvodu a TNF s poradím aminokyselín uvedených na obr. 10.

10. Zmes podľa nároku 9, v ktorej fyziologicky prijateľnou zložkou je prokaryotický proteín.

11. Zmes podľa nároku 9, ktorá je vlastne tvorená bunkou obsahujúcou heterológny ľudský TNF s poradím aminokyselín uvedených na obr. 10.

12. Zmes podľa nároku 11, v ktorej bunkou je prokaryotická alebo nižšia eukaryotická bunka.

13. Variant TNF podľa nároku 4, ktorý je schopný prednostnej deštrukcie alebo zastavenia rastu nádorových buniek v porovnaní s normálnymi bunkami pri rovnakých podmienkach, a ktorý obsahuje poradie aminokyselín 1 až 157 uvedených na obr. 10, ale na mieste lokalizovanom v polohe medzi 35 až 66, 110 až 133, alebo 150 až 157 zvyškov aminokyselín najmenej jedna z aminokyselín je substituovaná, vynechaná alebo vložená.

14. DNA kódujúca TNF podľa nárokov 4 až 13 uvedená na obr. 10.

15. DNA podľa nároku 14, kde táto DNA je syntetická.

16. DNA podľa nároku 14 prítomná v replikovateľnom vektore.

17. DNA podľa nároku 16, kde vektorom je plazmid alebo vírus.

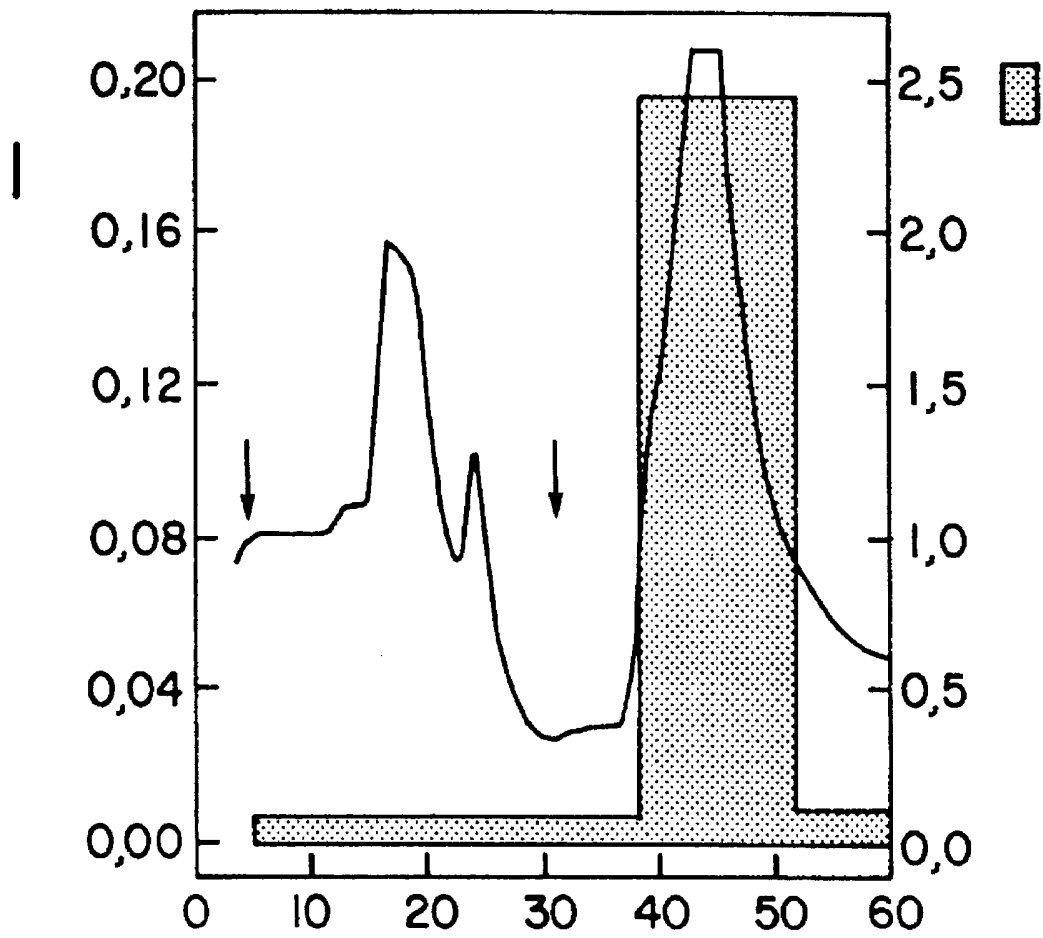
18. Bunka transformovaná s DNA podľa nároku 14 až 17.

19. Farmaceutický prostriedok na liečenie nádorov, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že obsahuje ľudský neglykozylovaný TNF podľa nároku 4 až 13 a ľudský interferón.

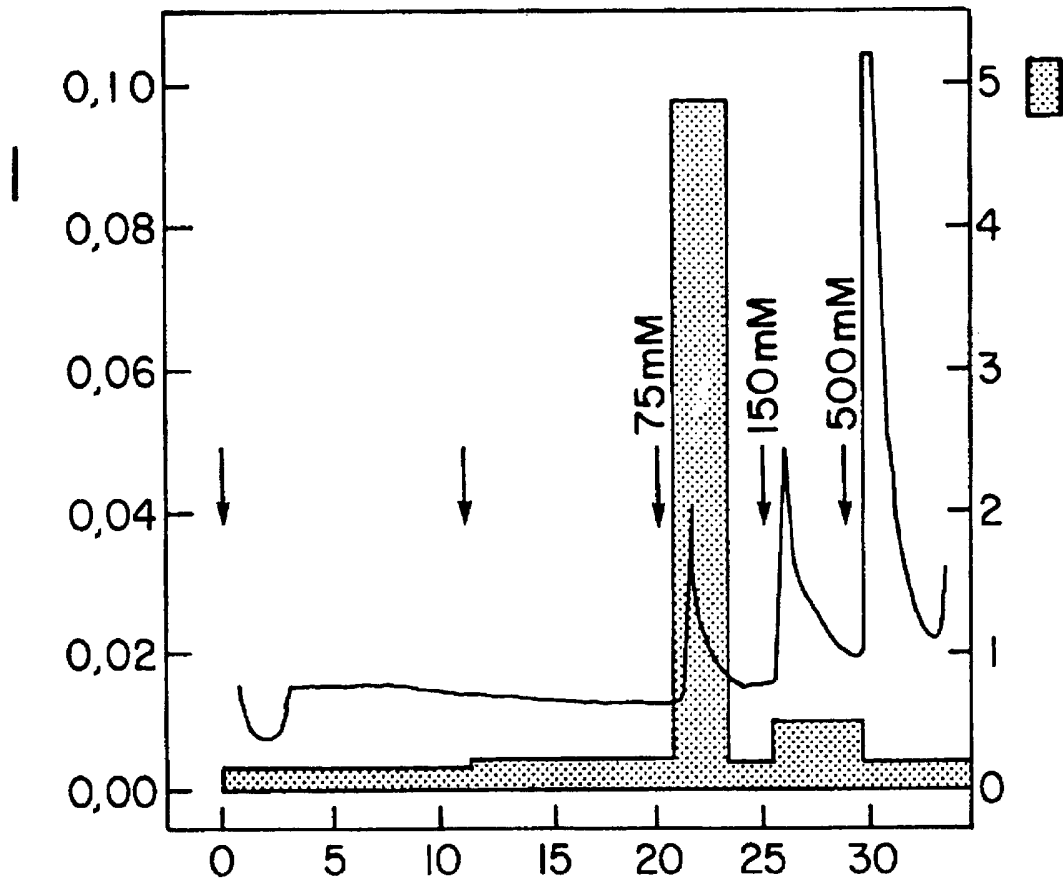
20. Farmaceutický prostriedok podľa nároku 19, **v y z n a ě u j ú c i s a t ý m**, že interferénom je gama-interferón.

## 11 výkresov

*Obr. 1*

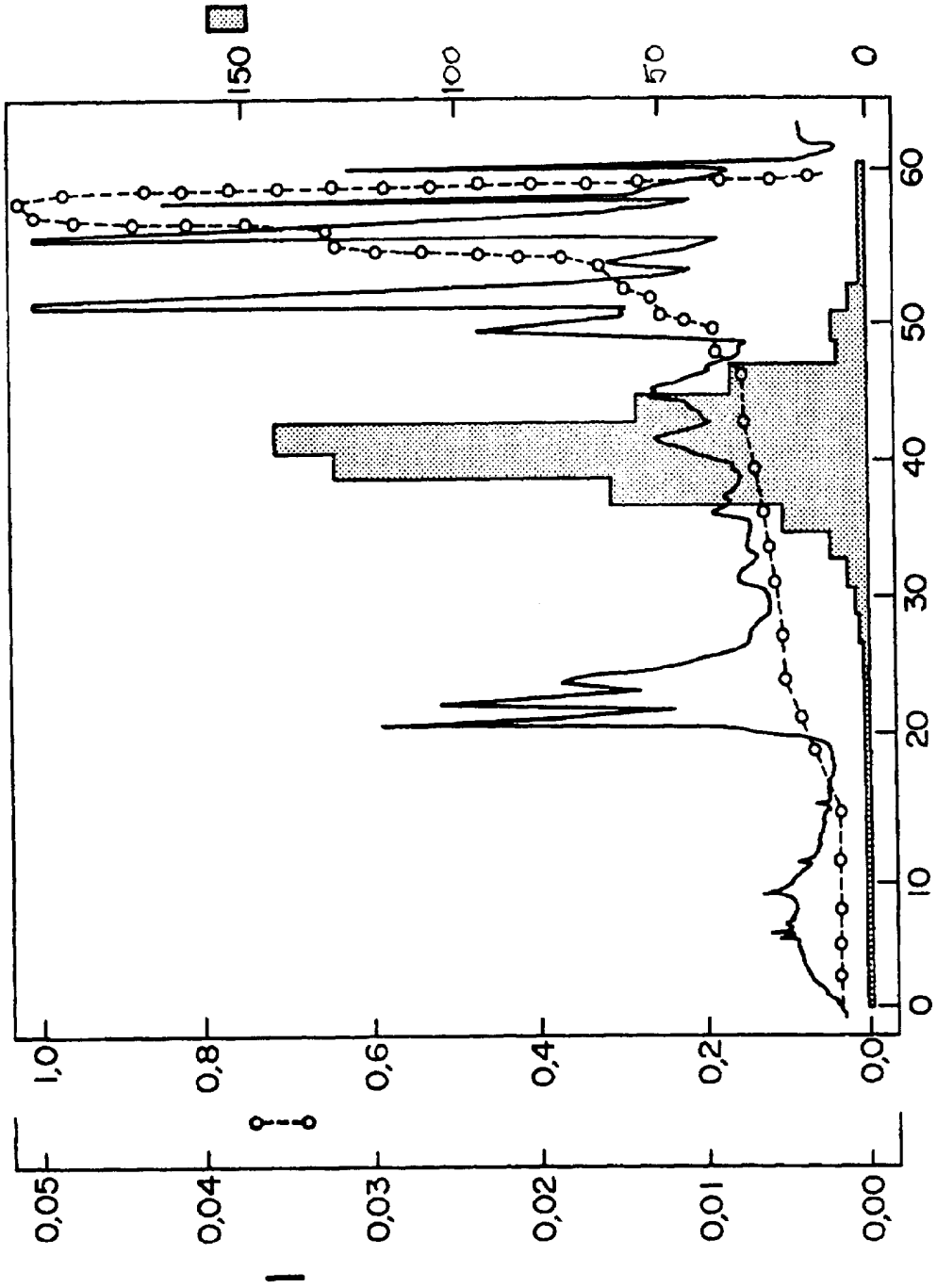


Obr. 2

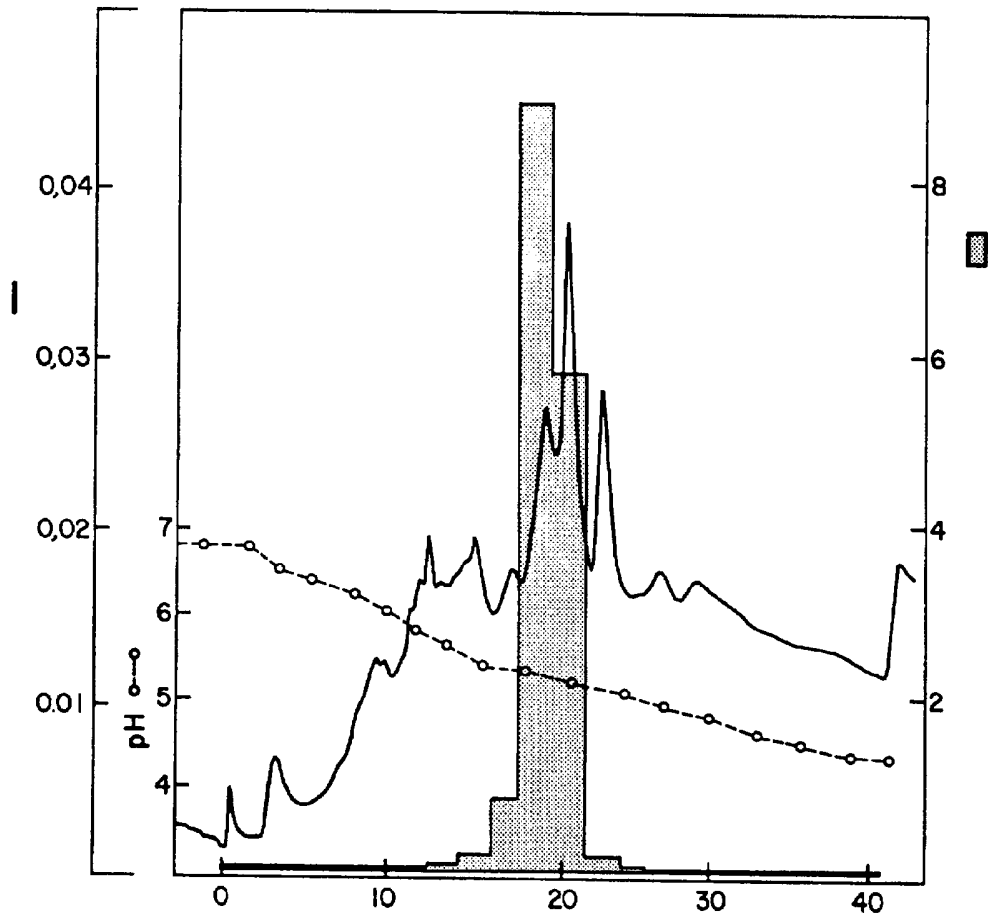




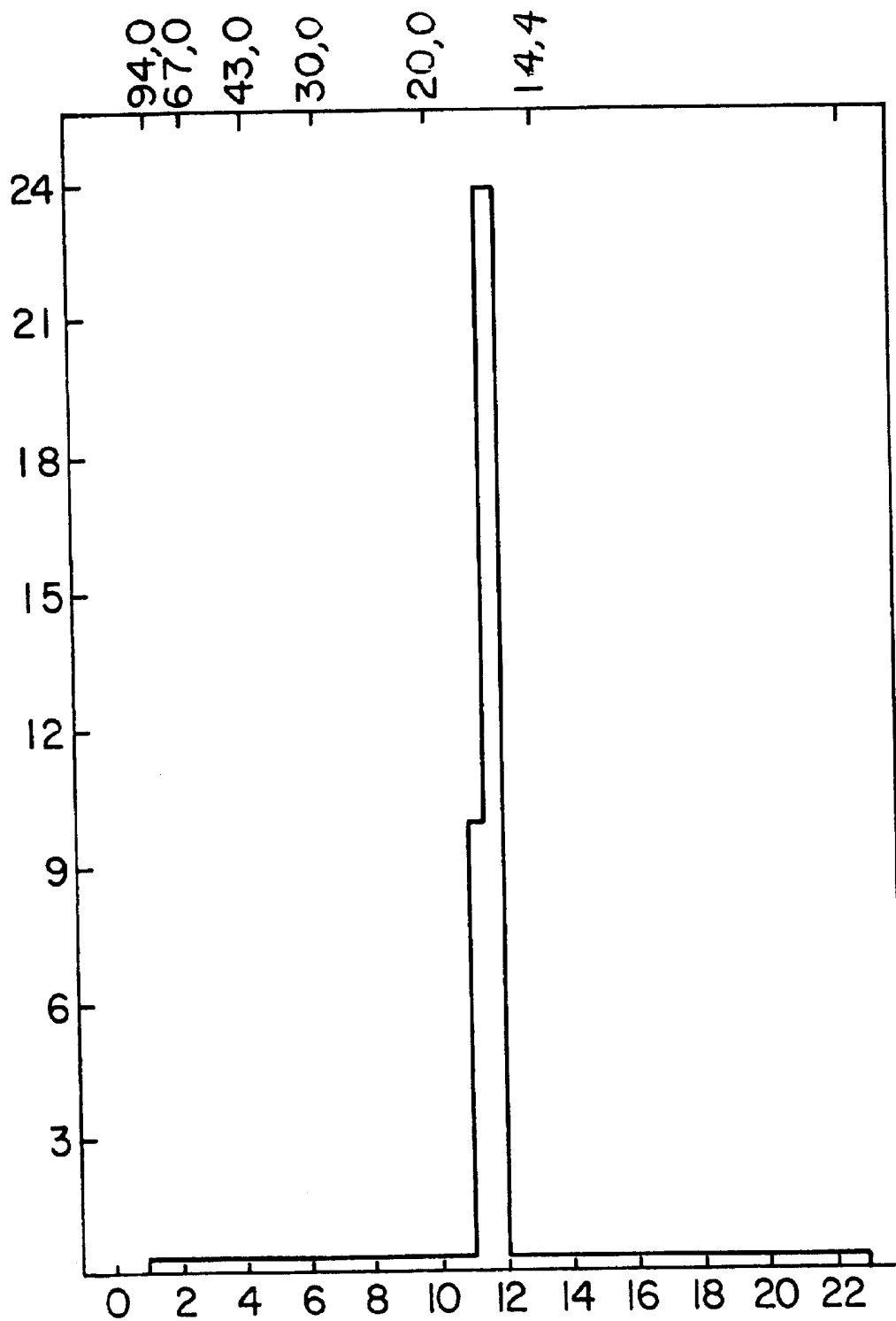
Obr. 3



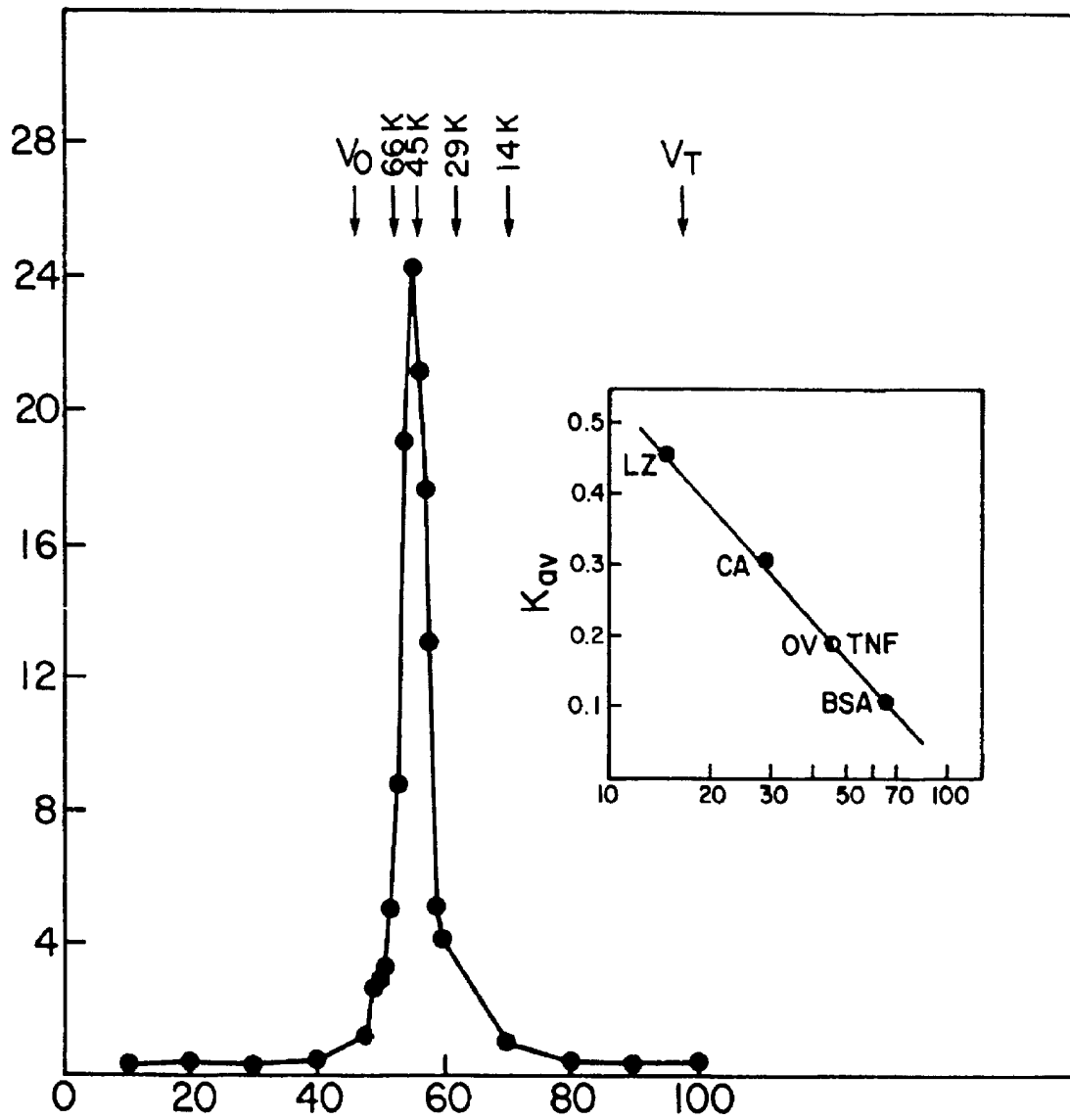
Obr.4



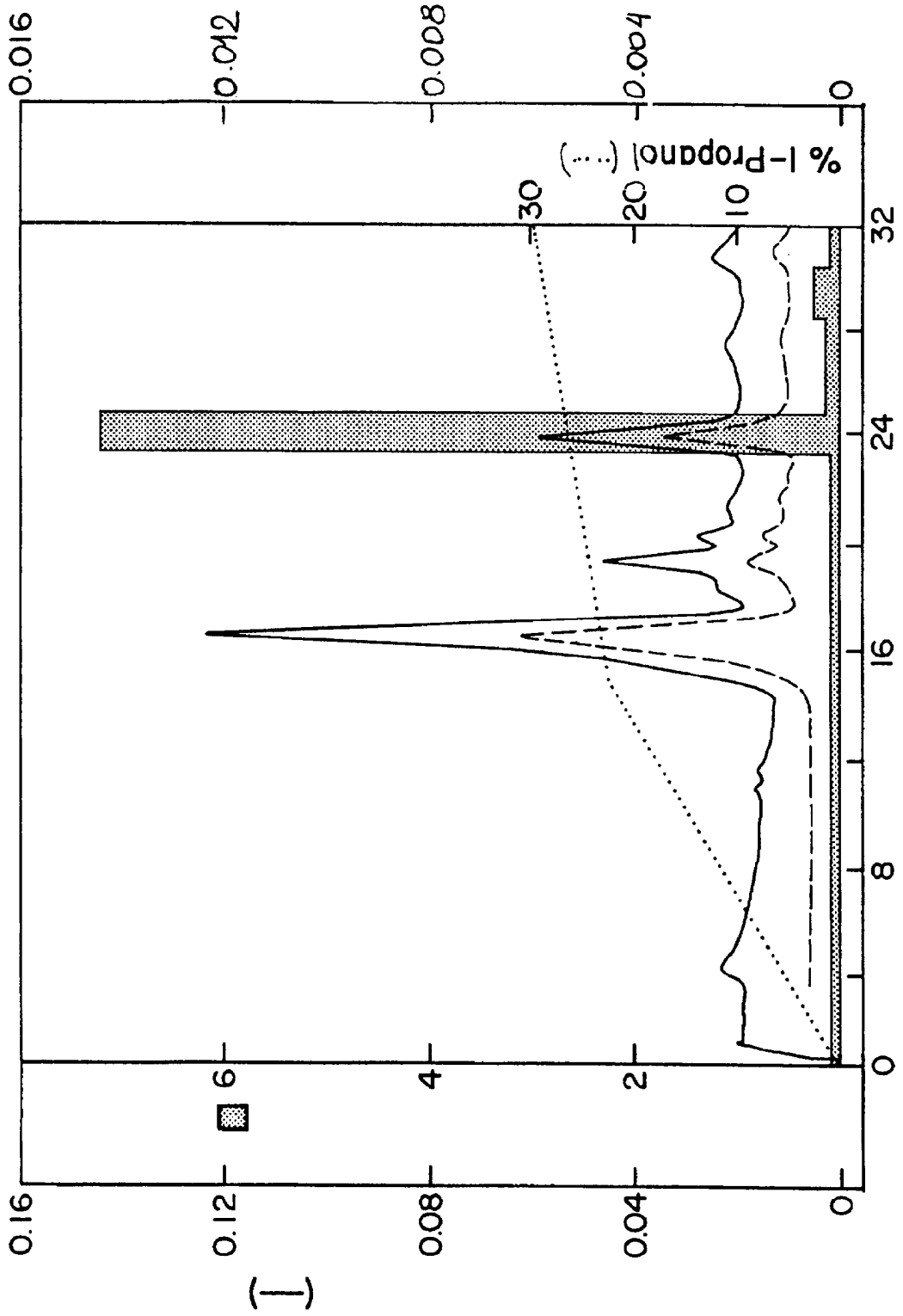
Obr. 5



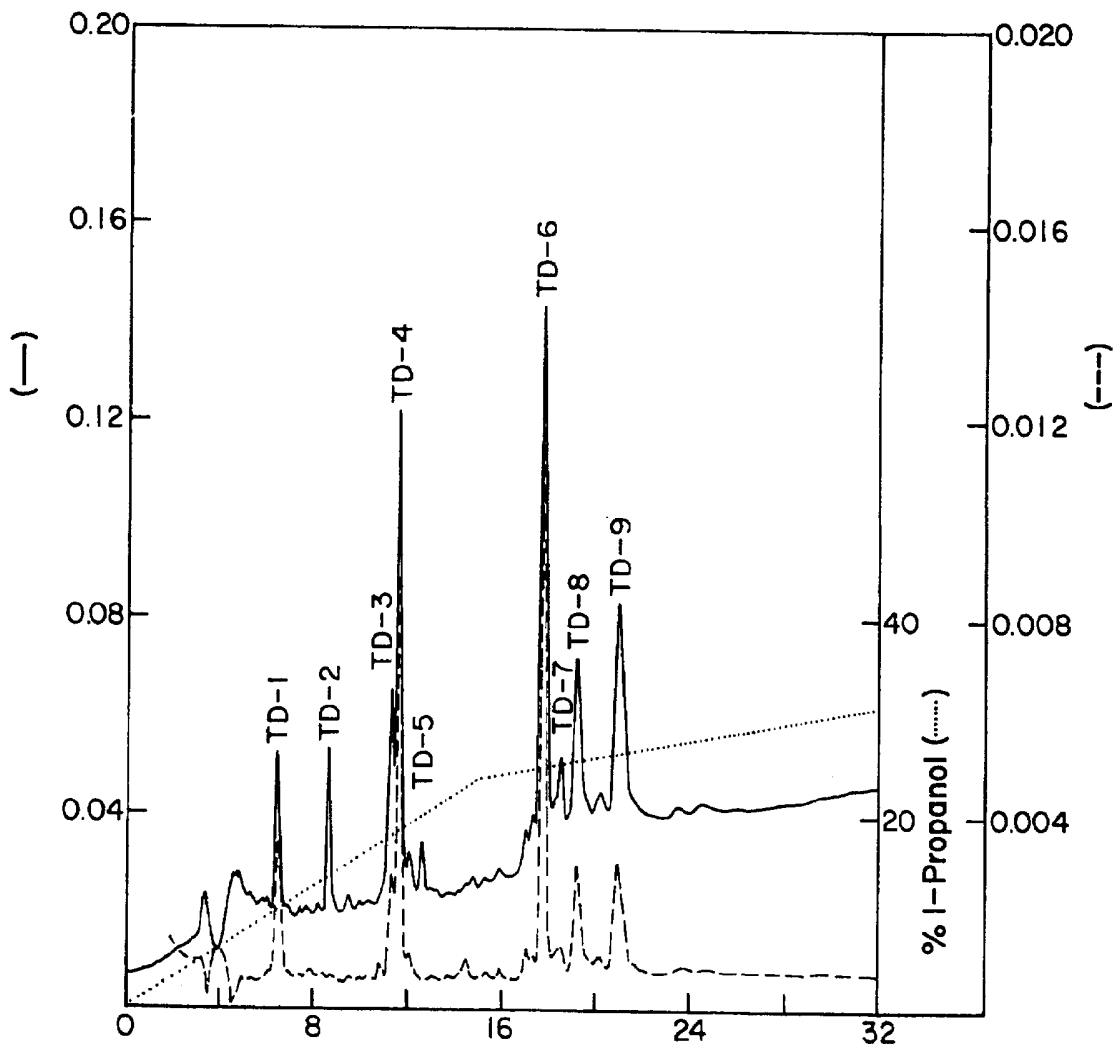
Obr.6.



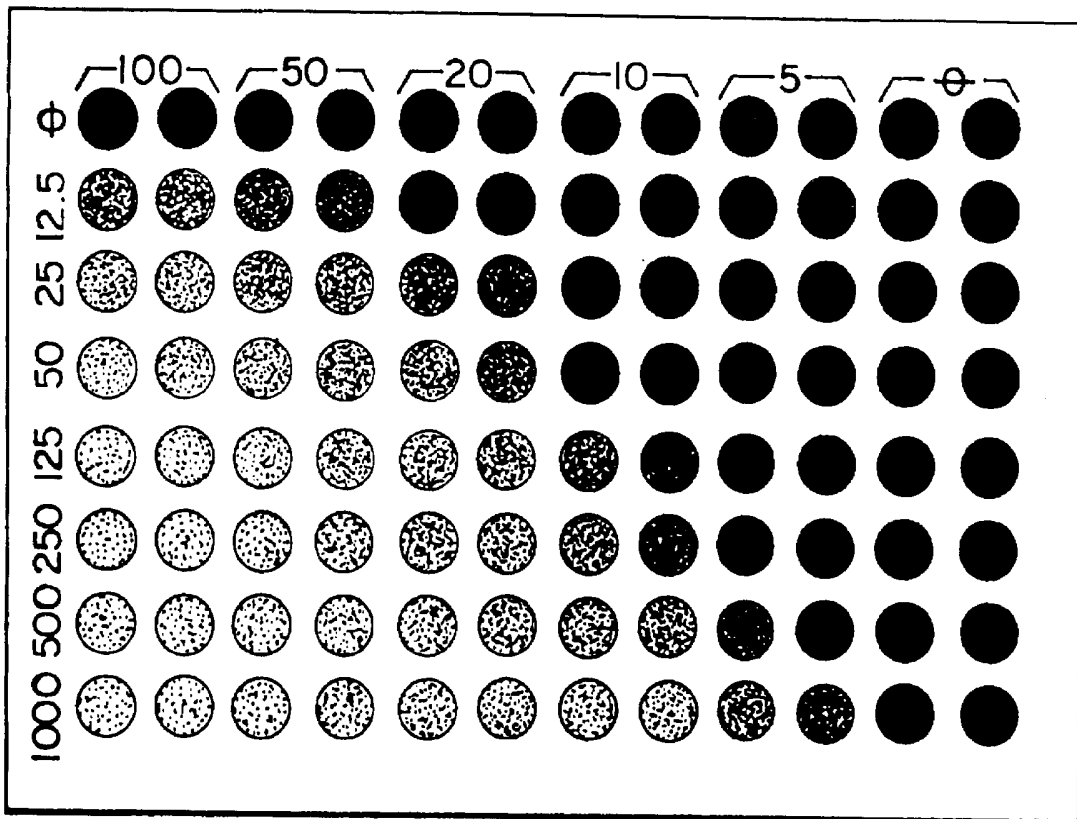
Obr. 7.



Obr. 8.



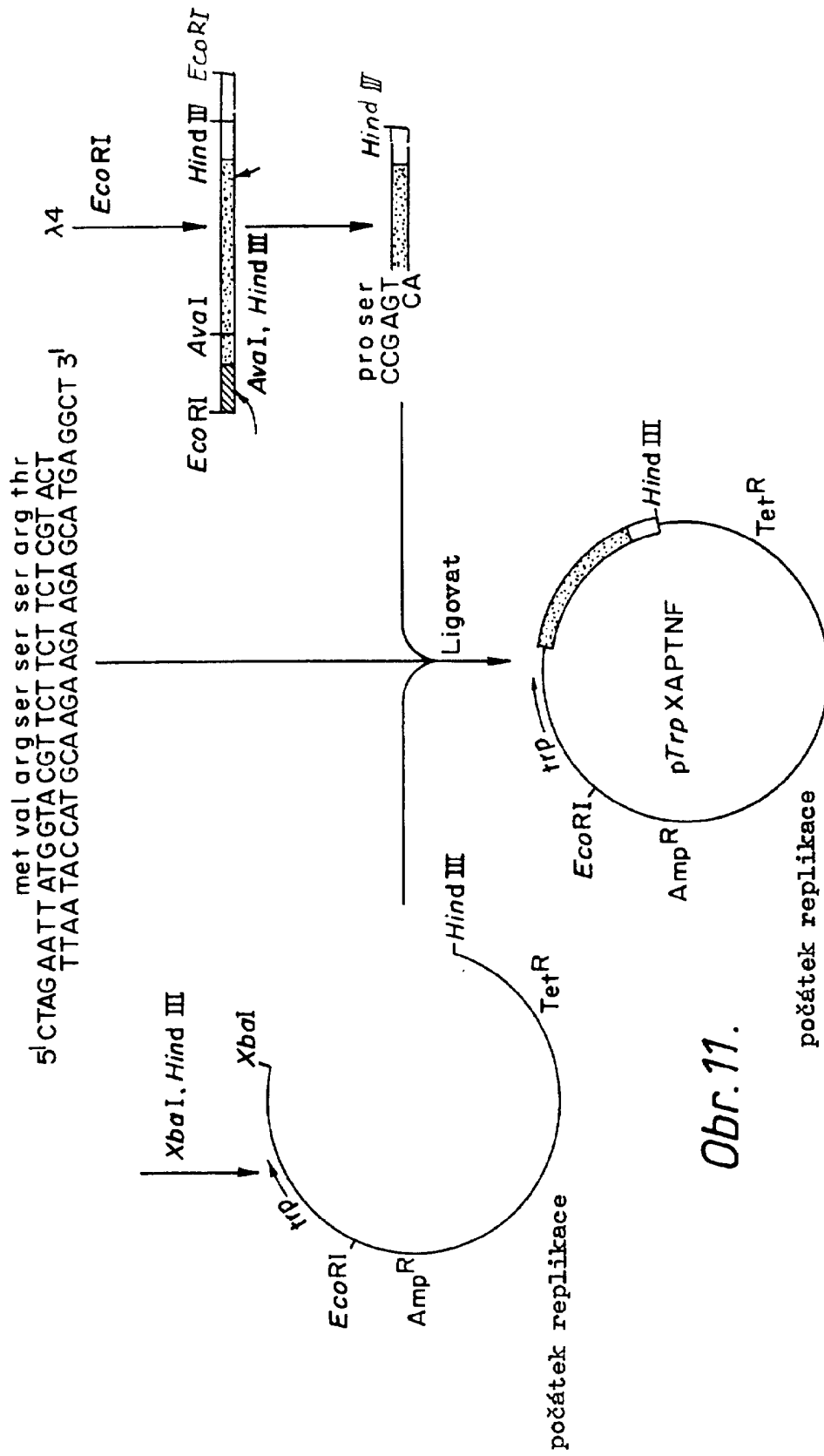
Obr. 9.



GCAGAGGACCAGCTAAGA  
 1  
 GGGAGAGAAGCAACTACAGACCCCTGAAACAAGCCCTCAGAGCCACACATCCCTGACAAAGCTGCCAGGAGTTCTCTCTCTCACATACATGACCCACGGCTCCACCCCTCTCTC  
 50  
 -76  
 met ser thr glu ser met ile arg asp val glu leu ala glu ala leu pro lys lys thr gly gly pro gln  
 ATG AGC ACT CAA AGC ATG ATC CCG CAC CTG GAG CTG GCC GAG GAG GCG CTC CCC AAG AAG ACA GGG GGG CCC CAG  
 100  
 -60  
 CCCTGGAAGGACACCC  
 150  
 -50  
 gly ser arg arg cys leu phe leu ser leu phe ser phe leu ile val ala gly ala thr thr leu phe cys leu leu his phe gly val  
 GGC TCC AGG CCG TCC ITG TTC CTC AGC CTC TTC TCC TTC CTG ATC CTG GCA GGC ACC AGG CTC TTC TGC CTC CTG CAC TTT GGA CTG  
 200  
 -30  
 -20  
 ile gly pro gln arg glu glu phe pro arg asp leu ser leu ile ser pro leu ala gln ala Val Arg Ser Ser Arg Thr Pro Ser  
 ATC GGC CCC CAG AGG CAA CAG TTC CCC AGG GAC CTC TCT CTA ATC AGC CCT CTG GCC CAG GCA GTC AGA TCA TCT TCT CGA ACC CCG AGT  
 300  
 1  
 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 Leu Phe Lys Gly Gln Gly Cys  
 GGC GTG GAG CTG AGA GAT AAC CAG CTG GTG GTG CCA TCA GAG GGC CTG TAC CTC ATC TAC TCC CAG GTC CTC TTC AAG GGC CAA GGC TGC  
 60  
 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 ACC CAC ACC ATC AGC CCG ATC GCC ATC GGC 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 Val Phe Gln Leu Glu Lys Gly  
 CCC TGC CAG AGG GAG ACC CCA CAG GGG GCT GAG GGC GCT GAG GGC ACC AAG CCC TGG TAT GAG CCC ATC TAT CTG GGA GGG GTC TTC CAG CTG GAG AAG GGT  
 120  
 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 CGG CCC GAC TAT CTC GAC TTT GCC GAG TCT GGG CAG GTC TAC TTT GGG ATC ATT GCC CTG TGA GGA  
 150  
 157  
 GGAGAACATCCAACTTCCCAAAGCGCTCCCTGCCCAATCCCTTTATTACCCCTCCTTCAGACACCCCTCAACCTCTTCTGGCTCAAAAAGAGAATTTGGGGCTTAGGGTCGGAACC  
 CAAGCTTAGAACTTTAAGCAACAAGACCACCCTTCGAAACCTGGGATTCAGGAATGTGGCTGCACAGTGAATTTGCTGGCAACCCTAAGAATTTCAAACCTCCAGAACTCA  
 CTGGGGCTACAGCTTTGATCCCTGACATCTGGAATCTGGAGACCGAGGAGCCCTTTGGTTCTGGCCAGAAATGTCAGGACTTGAGAAGACCTCACCCTAGAAAATGACACAAGTGGACCT  
 TAGGCCCTCCTCTCCTCCAGATGTTCCAGACTTCCTTGAGACACGAGGCCAGCCCTCCCATGGAGCCAGCTCCCTCATTATGTTGGACTTTGGATTATTTATTTATTTATTTA  
 TTTATTTATTTACAGATGAATGATTTATTTGGAGACCGGGGTATCCTGGGGACCCCAATGTAGAGCTGGCTTGAGACATGTTTTCCGTGAAAACGGAGCTGAACAATAGGCTG  
 TTCCCATGTAGCCCTGGCTCTGTGCTCTTTGATGATGTTTTTAAATATTTATCTGATTAAGTTGCTAAACAATGTGATTTGGTGACCAACTGTCACCTCATTGCTGAGCCT  
 CTGCTCCCCAGGGAGTTGTGCTGTAATCGCCCTACTATTTCAGTGGCGAGAAATAAAGTTTGTCTT

Obr. 10.





Obr. 11.