



(51) 7 C 07 K 14/52, C 12 N

15/19, 1/21, C

12 P 21/02, A 61 K 38/19

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ПАТЕНТНОЕ
ВЕДОМСТВО

(12) Описание изобретения К ПАТЕНТУ

Обязатель: " " " "

2

2. WO 90/07009 A1 (THE SECRETARY UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE), 28.06.90, с. 5-7, формула

3. Л.А. Осгерман, Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование, Изд. «Наука», М., 1981, с. 95, 96.

(54) Протеин с цитокиновой активностью, рекомбинантная ДНК, кодирующая этот протеин, трансформированные клетки и микроорганизмы.

(57) Настоящее изобретение относится к протеину с активностью цитокинового типа, или к предшественнику этого протеина, который включает последовательность следующих аминокислот (a 1):

(56) 1. K.D. BROWN et al., A famili of inducible protein secreted by leucocytes are members of a new superfamily that includes leucocyte and fibroblast-derived inflammatory agents, growt factors, and indicators of various processer
THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, 1989, v. 142, No2, 679-687

Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
1 5 10 15
Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
20 25 30
Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Xaa Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu
35 40 45
Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg
50 55 60
Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser
65 70 75 80
Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
85 90 95
Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
100 105 110

В которой Хаа означает Asp или Gly.

Предметом настоящего изобретения является новый протеин с цитокиновой активностью, методы генной инженерии для его продуцирования, а именно метод рекомбинантной ДНК, вектор экспрессии, несущий эту рекомбинантную ДНК, прокариоты и эукариотические клетки, содержащие эту рекомбинантную ДНК, а также лекарственное средство, использующееся в качестве иммуномодулятора, содержащее в качестве активного ингредиента этот протеин.

Хорошо известно, что иммунная система включает клеточные элементы и растворимые вещества, секретируемые цитокинами. Они представляют собой протеины, которые обеспечивают связывание между эмбрионической клеткой и соответствующей клеткой-мишенью, либо в иммунной системе, либо в другой биологической системе организма. Цитокины обычно обладают биологической, так называемой плеiotропной активностью: они могут оказывать множественные воздействия на клетку-мишень, как: пролиферация, дифференциация, цитоллиз, активация, хемотаксис и т.д. Множество из этих молекул уже нашло применение в терапии: например, как интерлейкин-2 или α -интерферон, используемые для лечения некоторых опухолей путем иммунотерапии, и миелопоэтические факторы, такие, как GCSF (стимулирующий гранулоцитарную колонию фактор) или GM-CSF (стимулирующий гранулоцитарную моноцитарную колонию фактор), которые стимулируют рост и дифференциацию клеток крови и таким образом способствуют обогащению крови, обедненной этими клетками, например, вследствие химиотерапии.

О цитокинах имеются следующие сведения:

1) Они способствуют секретируемому протеинам. Секрецию протеина, следовательно, в особенности цитокина, чаще всего происходит по механизму, который включает гидролиз аминоконцевой гидрофобной области преобразуемого протеина, называемой предпептидной последовательностью или сигнальным пептидом, во время экскреции зрелого протеина в среде (Von Heijne G., 1986, Nucl. Ac. Res., 14., 4683-4690). Большинство пептидных последовательностей известных цитокинов включает по существу один сигнальный пептид.

2) Цитокины обычно соответствуют протеинам, индуцируемым либо другими цитокинами (K. Matsushima и др. 1988, J. Exp. Med. 167, 1883-1893; Shimizu и др., 1990, Mol. Cell. B. Lett., 10, 561-568), либо химическими активаторами пролиферации и дифференциации клеток, такими, как липополисахариды, кальций-ионофоры, например, калимицин, циклический дибутрил-аденозин-5-монофосфат, диметилсульфоксид, ретиноевая кислота, конканавалин А, фитогемагглютинин (PHA-P) и сложные эфиры форбола, например, 2-миристилат-3-ацетат форбола (PMA) (Muegge K. и Ducun S.K. 1990, Cytokine 2, 1-8; C.B. Thompson и др., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci., 86, 1333-1337); либо антителами против поверхностных молекул, таких, как поверхностные антигены CD2, CD3, CD28 и CD40 (Tompson

C.B., и др., вышеуказанная ссылка; Rousset F. и др., J. Exp., Med. 173, 703-710).

3) При временной индукции цитокинов информационные (матричные) РНК цитокинов являются нестабильными. В случае большинства цитокинов они имеют области, обогащенные А и U, особенно последовательность AUUUA обобщающая типичная нестабильная последовательность выявлена D. Caput и др., 1986, Proc. Natl. Sci. США, 83, 1670-1674; G. Shaw и др., 1986, Cell, 46., 659-667; также, как K. Peppel и др., 1991, J. Exp., Med., 173, 349-355.

4) Преобладающее большинство известных цитокинов синтезируются клетками иммунной системы, особенно моноцитами и вспомогательными Т-лимфоцитами периферической крови (Ullman K. и др., 1989, Ann. Rev. Imm. 8, 421-452 и работа "Macrophage derived cell regulatory factors" C. Sorg, опубликованная в 1989 г. Karger - Bâle - Suisse). Их синтез индуцируется указанными в п. 2) индукторами.

Кроме того, известно, что из моноклеарных клеток периферической крови, образованных в основном лимфоцитами и моноцитами, культивированных и стимулированных с помощью различных индукторов, таких, как фитогемагглютинин, 2-миристилат-3-ацетат форбола и моноклональное антитело против CD2, можно сконструировать банк комплементарной ДНК без убиквитарных последовательностей комплементарной ДНК в клетках животных, и, следовательно, обогащенный комплементарной ДНК, кодирующей цитокины (H.C. Chang и др. Eur. J. Immun., 1989, 19, 1045-1051; P.F. Zippel и др., 1989, Mol. Cell. Biol., 9, 1041-1048).

С другой стороны, известно (C.B. Thompson и др., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 1333-1337; и Zindsten T. и др., 1989, Science, 244, 339), что продуцирование цитокинов (называемых лимфокинами) Т-лимфоцитами является более значительным, следовательно, соответствует гораздо большим количествам информационных РНК, при стимуляции с помощью бинарной комбинации: 2-миристилат-3-ацетат форбола и фитогемагглютинин или 2-миристилат-3-ацетат форбола и анти-CD28-антитело, чем только с помощью 2-миристилат-3-ацетат форбола; и с помощью бинарной композиции: 2-миристилат-3-ацетат форбола и фитогемагглютинин, чем с тройной комбинацией: 2-миристилат-3-ацетат форбола, фитогемагглютинин и циклоспорин А, причем циклоспорин А очевидно оказывает ингибирующее воздействие на транскрипцию информационных РНК цитокинов (Tompson и др., вышеуказанная ссылка, Mattila и др., 1990, EMBO J., 9, 4425-4433).

Эта дифференциальная экспрессия информационных РНК цитокинов в различных условиях стимулирования может служить "просеиванием", называемым "дифференциальным просеиванием" (cribbage différentiel), банка комплементарной ДНК, содержащей последовательности, кодирующие цитокины, с целью селекционирования этих последних последовательностей (см. особенно Dworkin и др., 1980, Dev. Biol., 76, 449-464; Cochran B.M. и др., 1983,

Cell, 33, 939-947; и Zippel P.F. и др., 1989, Mol. Cell. Biol., 9, 1041-1048). В самом деле, из двух информационных РНК, соответствующих двум состояниям стимуляции клеток, называемых здесь состояние стимуляции 1 и состояние стимуляции 2, причем состояние стимуляции 2 считается более обогащенным информационными РНК, кодирующими цитокины, чем состояние 1, можно сконструировать два радиоактивных зонда, называемых соответственно зонд 1 и зонд 2, которые являются транскриптами, получаемыми с помощью обратной транскриптазы этих двух информационных РНК. Эти два зонда гибридизируют с бактериальными колониями, содержащими последовательности комплементарной ДНК банка. Бактериальные колонии, содержащие комплементарную ДНК, где информационная РНК преимущественно изменяется между двумя состояниями активации, дают дифференциальные сигналы с двумя зондами, причем гибридизация более значительная для "захваченных" клонов (которые соответствуют

индуцируемыми протеинам) в случае зонда 2, чем зонда 1.

Кроме того, известно, что клетки COS, клетки обезьяньих почек, экспрессирующие Т-антиген вируса SV 40 Glugman Y., Cell, 23 1981, 175-182), которые допускают репликацию векторов, содержащих источник репликации ДНК вируса SV40, выбирают для изучения экспрессии генов в клетках животных и секретируют экспримируемых (экспрессированных) протеинов. Секретируют протеин в этих клетках указывает, что его секретирует (выделяет) клетка, которая его естественно продуцирует (H.C. Chang и др., Sur. J. Immun, 1989, 19, 1045-1051; и W.Y. Wetser и др., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci США: 86, 7522-7526).

Предметом настоящего изобретения является протеин с активностью цитокинового типа, или предшественник этого протеина, который включает следующую аминокислотную последовательность (ar):

Gl	Pro	Val	Pro	Pro	Ser	Thr	Ala	Le	Ar	Gl	Le	He	Gl	Gl	Le
u								u	g	u	u		u	u	u
1				5					10					15	
Val	As	He	Thr	Gi	As	Gi	Ly	Ala	Pro	Le	Cy	As	Gl	Ser	Me
	n			n	n	n	s			u	s	n	y		t
			20					25					30		
Val	Tip	Ser	He	As	Le	Thr	Ala	Xa	Me	Ty	Cy	Ala	Ala	Le	Gl
				n	u			a	t	g	s			u	u
		35					40					45			
Ser	Le	He	As	Val	Ser	Gl	Cy	Ser	Ala	lie	Gl	Ly	Thr	Gl	Ar
	u		n			y	s				u	s		n	g
	50					55					60				
Me	Le	Ser	Gl	Ph	Cy	Pro	His	Ly	Val	Ser	Ala	Gl	Gi	Ph	Ser
t	u		y	e	s			s				y	n	e	
65					70					75					80
Ser	Le	His	Val	Ar	As	Thr	Ly	He	Gl	Val	Ala	Gi	Ph	Val	Ly
	u			g	p		s		u			n	e		s
				85					90					95	
As	Le	Le	Le	His	Le	Ly	Ly	Le	Ph	Ar	Gl	Gl	Ar	Ph	As
p	u	u	u		u	s	s	u	e	g	u	y	g	e	n
			10					10					11		
			0					5					0		

в которой Хаа обозначает Asp или Gly, или последовательность, имеющую высокую степень гомологии с последовательностью (a₁).

Высокая степень гомологии здесь означает гомологию идентичности (соотношение между идентичными аминокислотами и общим числом аминокислот) по крайней мере на 80%, и предпочтительно по крайней мере на 90%, аминокислотных последовательностей, когда их сравнивают по максимальной гомологии, согласно методу оптимального согласования последовательностей Needleman и Wunsch 1970, J. Mol. Biol., 48, 443-453. Этот алгоритмический метод, согласно которому рассматривают все возможные согласования и создают согласованный ряд, в котором как можно больше идентичных аминокислот подбирают под пары и число пропусков в

согласованных последовательностях является минимальным, особенно используют в программном обеспечении UWGCG университета в Висконсине; Dewereux и др. 1984, Nuct. Ac. Res. 12 8711-8722 - версия GAP.

Уже известной пептидной последовательностью, наиболее близкой к таковой последовательности (a₁) из 112 аминокислот, является последовательность из 132 аминокислот, полученная из комплементарной ДНК протеина Р600 мыши, описанная K.D. Brown и др., 1989, J. Omm, 142, 679-687 (протеин, экспримируемый ТН2-лимфоцитами мыши, функция которого не выяснена). Сравнение этих пептидных последовательностей с помощью метода Needleman и Wunsch, 1970, J. Mol. Biol., 48, 443-453, показывает, что 63 аминокислоты из 112 идентичны, или гомология идентичности составляет около 56%.

Предметом настоящего изобретения является протеин, секретируемый Т-лимфоцитами и индуцируемый в них 2-миристат-3-ацетатом форболом, причем индукция цитокина (см. вышеприведенный текст) осуществляется под действием фитогемагглютинина или моноклонального анти-CD 28-антитела, причем терминирующее действие на амплификацию оказывает стимулирование фитогемагглютинином в присутствии циклоспорина А. Протеин согласно изобретению, называемый протеином NC30, следовательно, представляет собой новый человеческий лимфокин, обладающий иммуномодуляторными активностями цитокинового типа (пролиферация клеток, активация клеток, хемотаксис и регуляция синтеза других цитокинов). Он воздействует, по крайней мере, на два вида ключевых клеток иммунной системы: моноциты и β -лимфоциты. Следовательно, речь идет о новом интерлейкине. Некоторые из его свойств являются общими с интерлейкином-4: ингибирование синтеза интерлейкина-1 β и интерлейкина-6 моноцитами периферической крови, активированными ЛПС (липолисахарид), и модуляция экспрессии антигена CD23 в β -лимфоцитах миндалин. Эти два свойства также присущи интерлейкину-4 (W Paul, 1991, Blood, 77, 1959; и Waal Malefyt и др., 1991, J. Exp. Med., 174, 1199-1220).

Протеин согласно изобретению является новым интерлейкином лимфокинового типа. Он представляет интерес в качестве активного начала лекарственного средства, пригодного для обработки путем иммуномодуляции опухолей и лечения некоторых инфекционных или воспалительных заболеваний.

Протеин согласно изобретению может включать, непосредственно выше последовательности (a_1), одну или несколько аминокислот, в особенности последовательность: Seg-Pro.

Этот протеин предпочтительно находится в форме, которая имеет кажущуюся молекулярную

массу, определяемую путем электрофореза на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS), $9,0 \pm 2$ или $16,0 \pm 2$ kDa. Он предпочтительно N-гликозилирован, в особенности когда он имеет кажущуюся молекулярную массу $16,0 \pm 2$ kDa.

Представляет интерес то, что этот протеин имеет степень чистоты, определяемую путем электрофореза на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и проявления серебром, выше 70%, и предпочтительно выше 90%.

Предметом изобретения также является рекомбинантная ДНК, которая кодирует вышеуказанный протеин, полученный из клеточного лизата, или, предпочтительно, кодирует предшественник вышеуказанного протеина. Этот предшественник предпочтительно включает сигнальную последовательность.

Функцией этой сигнальной последовательности, выбираемой в зависимости от клетки-хозяина, является стимулирование экскреции рекомбинантного протеина из цитоплазмы, что позволяет рекомбинантному протеину принимать конформацию, близкую к таковой природного протеина, и заметно облегчает его очистку. Эта сигнальная последовательность может быть гидролизована либо в несколько стадий с помощью сигнальной пептидазы, которая высвобождает зрелый протеин, либо в несколько стадий, когда эта сигнальная последовательность включает, кроме последовательности, удаляемой с помощью сигнальной пептидазы, называемой сигнальным пептидом или предпоследовательностью, последовательность, удаляемую позднее в процессе одного или нескольких протеолитических событий, называемую про-последовательностью.

Кодирующей зрелый протеин последовательностью является, например, одна из следующих (Na_1) или (Na_1) последовательностей:

(Na_1)

GGCCCTGTGC
AGGAGCTGGT
CTGCAATGGC
GACATGTACT
CAGGCTGCAG
CGGATTCTGC
AGCTTGCATG
TTGTAAAGGA
CGAGGGACGG

CTCCCTCTAC
CAACATCACC
AGCATGGTAT
GTGCAGCCCT
TGCCATCGAG
CCGCACAAGG
TCCGAGACAC
CCTGCTCTTA
TTC'AAC

AGCCCTCAGG
CAGAACCAGA
GGAGCATCAA
GGAATCCCTG
AAGACCCAGA
TCTCAGCTGG
CAAAATCGAG
CATTTAAAGA

GAGCTCATTG
AGGCTCCGCT
CCTGACAGCT
ATCAACGTGT
GGATGCTGAG
GCAGTTTTCC
GTGGCCCACT
AACTTTTTCC

(Na_1)

GGCCCTGTGC
AGGAGCTGGT
CTGCAATGGC
GGCATGTACT
CAGGCTGCAG
CGGATTCTGC
AGCTTGCATG
TTGTAAAGGA

CTCCCTCTAC
CAACATCACC
AGCATGGTAT
GTGCAGCCCT
TGCCATCGAG
CCGCACAAGG
TCCGAGACAC
CCTGCTCTTA

AGCCCTCAGG
CAGAACCAGA
GGAGCATCAA
GGAATCCCTG
AAGACCCAGA
TCTCAGCTGG
CAAAATCGAG
CATTTAAAGA

GAGCTCATTG
AGGCTCCGCT
CCTGACAGCT
ATCAACGTGT
GGATGCTGAG
GCAGTTTTCC
GTGGCCCACT
AACTTTTTCC

CGAGGGACGG TICAAC

Для экспрессии в прокариотах, таких, как, например, *Escherichia coli* эта сигнальная последовательность может представлять собой либо последовательность, являющуюся производной последовательности, кодирующей природный предшественник протенина, экспортируемого прокариотом (например, сигнальный пептид OmPA (Ghrayeb и др., 1984, EMBO Journal 3, 2437-2442) или сигнальный пептид щелочной фосфатазы (Michaelis и др. J. Bact., 1983,

154, 366-374), либо неэндогенную последовательность, происходящую от последовательности, кодирующей эукариотический предшественник (например, сигнальный пептид одного из природных предшественников гормона человеческого роста), либо последовательность, кодирующую сигнальный синтетический пептид (например, таковой, описанный в заявке на патент Франции № 2 636 643), с последовательностью:

Met	Ala	Pro	Ser	Gly	Lys	Ser	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu
1				5				10						15	
Cys	Leu	Pro	Ser	Trp	Asn	Ala	Gly	Ala							
			20					25							

Для экспрессии в эукариотических клетках, таких, как аскомицеты, например, дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* или филаментозный гриб *Cryphonestria parasitica*, эта сигнальная последовательность предпочтительно является последовательностью, происходящей от последовательности, кодирующей

природный предшественник секретируемого этими клетками протенина, например, в случае дрожжей предшественник инвертазы (европейская заявка на патент 0123289) или предшественник пре-последовательности альфа-феромона (заявка на патент Дании 2484/84), или в случае *Cryphonestria parasitica* предшественник пре-последовательности эндотиапепсина, с последовательностью:

Met	Ser	Ser	Pro	Leu	Lys	Asn	Ala	Leu	Val	Thr	Ala	Met	Leu	Ala	Gly
1				5				10						15	
Gly	Ala	Leu	Ser	Ser	Pro	Thr	Lys	Gln	His	Val	Gly	He	Pro	Val	Asn
			20					25					30		
Ala	Ser	Pro	Glu	Val	Gly	Pro	Gly	Lys	Tyr	Ser	Ph	Lys	Gln	Val	Arg
		35			40							45			
Asn	Pro	Asn	Tyr	Lys	Phe	Asn	Gly	Pro	Leu	Ser	Val	Lys	Lys	Thr	Tyr
	50					55					60				
Leu	Lys	Tyr	Gly	Val	Pro	He	Pro	Ala	Trp	Leu	Glu	Asp	Ala	Val	Gln
										75					80
65					70										
Asn	Ser	Thr	Ser	Gly	Leu	Ala	Glu	Arg							
					85										

Для экспрессии в клетках животных, в качестве сигнальной последовательности используют либо сигнальную последовательность в отношении экспортирования из животных клеток протенина - например, последовательность, кодирующую сигнальный пептид одного из природных предшественни-

ков человеческого гормона роста, уже известную с точки зрения возможности секреции интерлейкина-2 (см. заявку на патент Франции 2 619 711), либо одну из следующих четырех последовательностей (б 1), (б 2), (б 3) и (б 4):

(b1)

Met	His	Pro	Leu	Leu	Asn	Pro	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Met	Ala
1			5					10						15	
Leu	Leu	Leu	Thr	Thr	Val	Ile	Ala	Leu	Thr	Cys	Leu	Gly	Gly	Phe	Ala
	u	u						u			u				

2 2 3
0 5 0

(b2)

Met	His	Pro	Leu	Leu	Asn	Pro	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Leu	Met	Ala
1			5	5				10							15
Leu	Leu	Leu	Thr	Thr	Val	He	Ala	Leu	Thr	Cys	Leu	Gly	Gly	Phe	Ala
			20					25					30		
Ser	Pro														

(b3)

Met	Ala	Leu	Leu	Leu	Thr	Thr	Val	He	Ala	Leu	Thr	Cys	Leu	Gly	Gly
1			5	5				10						15	
Phe	Ala														

(b4)

Met	Ala	Leu	Leu	Leu	Thr	Thr	Val	He	Ala	Leu	Thr	Cys	Leu	Gly	Gly
1			5	5				10						15	
Phe	Ala	Ser	Pro												
			20												

предпочтительно кодированных соответственно следующими последовательностями (Nb 1), (Nb 2), (Nb 3) и (Nb 4):

(Nb1)

ATGCATCCGC	TCCTCAATCC	TCTCCTGTTG	GCACTGGGCC
TCATGGCGCT	TTTGTTGACC	ACGGTCATTG	CTCTCACTTG
CCTTGGCGGC	TTTGCC		

(Nb2)

ATGCATCCGC	TCCTCAATCC	TCTCCTGTTG	GCACTGGGCC
TCATGGCGCT	TTTGTTGACC	ACGGTCATTG	CTCTCACTTG
CCTTGGCGGC	TTTGCCCTCC	CA	

(Nb3)

ATGGCGCTTT	TGTTGACCAC	GGTCATTGCT	CTCACTTGCC
TTGGCGGCTT	TGCC		

(Nb4)

ATGGCGCTTT	TGTTGACCAC	GGTCATTGCT	CTCACTTGCC
TTGGCGGCTT	TGCCTCCCCA		

Изобретение относится также к вектору экспрессии, включающий вышеуказанную рекомбинантную ДНК.

Экспрессии прокариотов, в особенности в *Escherichia coli*, осуществляется путем включения рекомбинантной ДНК в вектор экспрессии, содержащий эффективный промотор, следующий за сайтом фиксации рибосом выше экспримируемого гена, также, как эффективную в отношении терминации транскрипции последовательность ниже экспримируемого гена. Эта плазмида также должна включать

источник репликации и маркер селекции. Все эти последовательности должны выбираться в зависимости от клетки-хозяина.

Для экспрессии в эукариотических клетках, экспрессирующий вектор согласно изобретению включает вышеуказанную рекомбинантную ДНК со средствами, необходимыми для ее экспрессии, ее репликации в этих клетках и селекции трансформированных клеток. Предпочтительно, этот вектор включает маркер селекции, выбираемый, например, для комплементации мутации эукариотических рецепторных клеток, который позволяет осуществлять селекцию

клеток, которые интегрированы рекомбинантной ДНК, в виде повышенного числа копий, либо в их геноме, либо в мульткопийном векторе.

Для экспрессии в эукариотических клетках, таких, как дрожжи, например, *Saccharomyces cerevisiae*, следует встраивать рекомбинантную ДНК между, с одной стороны промотором и, с другой стороны, терминатором транскрипции. Совокупность промотор-кодирующая последовательность-терминатор, называемую кассетой экспрессии, клонируют либо в монокопийном или поликопийном плазмидном векторе, либо в виде мульткопии интегрируют в геном дрожжей.

Для экспрессии в эукариотических клетках, таких, как клетки филаментозных грибов, группы аскомицетов, например, таковых родов *Aspergillus*, *Podospora*, *Trichoderma*, *Neurospora* или *Cryphonectria*, экспрессирующий вектор согласно изобретению включает вышеуказанную рекомбинантную ДНК со средствами, необходимыми для его экспрессии, и возможно маркер селекции и/или телометрические последовательности. В самом деле, можно селекционировать трансформанты, интегрированные целевой ДНК, с помощью маркера селекции, находящегося либо в том же векторе, что и целевая ДНК, либо в другом векторе, причем тогда эти два вектора вводятся путем котрансформации. Рекомбинантная ДНК согласно изобретению может быть либо интегрирована в геном филаментозных грибов, либо сохранена во внехромосомной форме благодаря последовательностям, допускающим репликацию и расщепление этой ДНК.

Для экспрессии в клетках животных, особенно в клетках яичников китайского хомячка СНО, рекомбинантную ДНК предпочтительно встраивать в плазмиду (например, происходящую от рBR 322), включающую либо одну единицу экспрессии, в которую встроена рекомбинантная ДНК, согласно изобретению, и возможно маркер селекции, перед эффективным промотором, либо две единицы экспрессии. Первая единица экспрессии включает вышеуказанную рекомбинантную ДНК, предшествующую эффективному промотору (например, ранний промотор SV 40). Иницирующую последовательность около ATG (антигипотимидинный глобулин) предпочтительно выбирают в зависимости от обобщающей типичной последовательности, описанной Kozak (M. Kozak (1978), Cell, 15, 1109-1123). Интроновая последовательность, например, интрон α -глобулина мыши, может быть включена выше рекомбинантной ДНК, также, как последовательность, включающая сайт полиаденилирования, например, последовательность полиаденилирования SV 40, может быть включена ниже рекомбинантного гена. Вторая единица экспрессии включает маркер селекции, например, последовательность ДНК, кодирующую дигидрофоллатредуктазу (фермент, ниже сокращенно называемый ДГФР). Плазмиду трансфицируют в клетки животных, например, клетки СНО dhfr- (неспособные экспримировать ДГФР). Линию (клеток) селекционируют по ее резистентности к метотрексату:

интегрируют в ее геном повышенное число копий рекомбинантной ДНК и экспрессируют эту последнюю на достаточном уровне.

Изобретение также относится к прокариотным микроорганизмам, трансформированным вышеуказанным вектором экспрессии, в особенности таким вида *Escherichia coli*, также, как к эукариотическим клеткам, которые содержат вышеуказанную рекомбинантную ДНК. Ее можно вводить путем трансформации за счет вышеуказанного экспрессирующего вектора или в виде самой по себе рекомбинантной ДНК согласно изобретению, которая иногда может быть интегрирована прямо в геном в локусе, который допускает ее экспрессию.

Представляющие интерес эукариотические клетки являются клетками животных.

Рекомбинантную ДНК, например, можно вводить в эти клетки путем трансфекции за счет вышеуказанного экспрессирующего вектора, путем инфекции с помощью вируса или ретровируса, содержащего ее, или путем микроинъектирования. Предпочтительными животными клетками являются клетки СНО, в особенности клетки СНО dhfr-, из которых можно получать высокопродуктивные протеины согласно изобретению линии. Клетки COS также представляют собой предпочтительного хозяина для получения этого протеина.

Другими, представляющими интерес эукариотическими клетками являются дрожжевые клетки, в особенности клетки *Saccharomyces cerevisiae*.

Изобретение также относится к способу получения вышеуказанного протеина, который включает стадию культивирования вышеуказанных животных клеток или клеток дрожжей, с последующими стадиями выделения и очистки рекомбинантного протеина.

Изобретение также относится к рекомбинантному протеину, который может быть получен способом, включающим стадию культивирования этих животных клеток или клеток дрожжей, с последующими стадиями выделения и очистки рекомбинантного протеина.

Следовательно, предметом изобретения также является лекарственное средство, использующееся особенно в онкологии и при лечении иммуномодулирующей некоторых инфекционных состояний и некоторых воспалительных состояний, которое содержит в качестве активного ингредиента вышеуказанный протеин в фармацевтически приемлемом эксципиенте. Они могут быть использованы индивидуально или в сочетании с другими активными агентами, например, с одним или несколькими цитокинами.

Изобретение подробнее поясняется в нижеприведенном описании, представляемом в виде разделов, которое включает экспериментальные результаты и их обсуждение.

Некоторые из этих разделов относятся к экспериментам, осуществляемым с целью реализации изобретения, другие примеры реализации изобретения даются, разумеется, чисто в иллюстративном плане.

Большая часть совокупности описанных в этих разделах приемов (методов), хорошо известных специалисту, подробно описана в работе Sambrook, Fritsch и Maniatis: "Molecular cloning: a Laboratory manual", опубликованной в 1989 г. издателями Cold Spring Harbor Press в Нью-Йорке (2-е издание).

Нижеследующее описание для лучшего понимания сопровождается рисунками 1а, 1б, 1в, 2, 3, 4, 5, 6 и 7.

На фиг. 1а представлена общая генетическая карта плазмиды pSEI, являющейся плазмидой клонирования в *E. coli* и экспрессии в клетках животных, причем сайты, исчезающие за счет лигирования, указаны в скобках. Используемые на этом рисунке символы уточняются в описании этой плазмиды (раздел 2).

На фиг. 1б представлена последовательность синтетического фрагмента "сайт связывания Hind III" - Hind III, используемого для конструирования плазмиды pSEI.

На фиг. 1в представлена последовательность синтетического фрагмента Hind III - "сайт связывания BamHI".

На фиг. 2 представлена нуклеотидная последовательность кДНК NC30 и напротив - выведенная аминокислотная последовательность, где подчеркнуты два Met, способные инициировать трансляцию, причем возможные места расщепления сигнального пептида указываются вертикальными стрелками, а четыре возможных области N-гликозилирования подчеркнуты пунктирной линией.

На фиг. 3 и 4 представлены соответственно согласование по максимальной гомологии согласно методу Needleman и Wunsch, 1970, J. Med. Biol. 48, 443-453, аминокислотной последовательности, выведенной из кДНК NC30 (верхний ряд) и последовательности, выведенной из кДНК протейна Р600 мыши (нижний ряд), и согласование согласно этому методу кодирующей части кДНК ЫС30 (верхний ряд) и кодирующей части кДНК протейна Р600 (нижний ряд).

На фиг. 5 представлена последовательность фрагмента В, причем область молчащей мутации по отношению к кДНК NC30 указывается звездочкой.

На фиг. 6 и 7 представлены изменение оптической плотности и/или плотности клеток линии В9 в зависимости от концентрации очищенного протейна NC30, продуцированного из супернатанта клеток C0S (фиг. 6), и проросшего от дрожжей (фиг. 7).

РАЗДЕЛ I

Культивирование и стимулирование с помощью РМА и РНА-Р мононуклеарных клеток периферической крови.

Получение информационной РНК, используемой для создания банка комплементарной ДНК

1) Культивирование и стимулирование мононуклеарных клеток периферической крови:

Из аликвот периферической крови (отобранной у трех здоровых доноров в центре переливания крови), предварительно подвергнутой пнстафореу и градиенту Фиколла (Pharmacia, Boyum, A. 1968,

Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21, с. 77-89), отбирают фракцию клеток, обогащенную мононуклеарными клетками периферической крови PBMNC (мононуклеарные клетки периферической крови) следующего - приблизительного состава: 70% лимфоцитов, 25% моноцитов и 5% гранулоцитов (подсчет клеток проводится с помощью счетчика клеток Coulter модель S- Plus 1Y).

Клетки помещают в колбу емкостью 250 мл, затем центрифугируют в течение 10 минут при 37°C при 300 g.

Супернатант удаляют и осадок клеток промывают 50 мл среды, включающей глюкозу, минеральные соли, аминокислоты и витамины, называемой средой R PM1 (среда R PM1 1640 фирмы Гибко BRL), затем снова центрифугируют в тех же условиях.

Осадок клеток затем обрабатывают с помощью 500 мл среды R PMГ, дополненной 10% плодной телячьей сыворотки (Гибко BRL - стандартное обозначение: 013-06290H), с добавленными 10 единицами пенициллина и 10 мкг стептомицина (раствор пенициллина со стрептомицином, фирма Гибко, стандартное обозначение: 043-05140) на 1 мл среды, также, как L-глутамином (Гибко BRL - стандартное обозначение: 043-05030) вплоть до конечной концентрации 2 ммоль.

Одну часть суспензии клеток распределяют, с целью разделения адгезивных клеток и неадгезивных клеток, примерно по 100 мл на чашку (камеру), в четыре большие квадратные чашки для культивирования (размером 245x245x20 мм; Nunc; стандартное обозначение: 166508) и инкубируют в течение 1 часа при 37°C. Известно, что большинство моноцитарных клеток прилипают к чашке для культивирования, тогда как большинство лимфоцитарных клеток остаются в суспензии.

Неадгезивные клетки отбирают с помощью пипетки и культивируют в колбах для культивирования типа Falcon с поверхностью 175 см² в присутствии среды RPM1, дополненной как описано выше, к которой добавлено 10 нг/мл 2-миристат-3-ацетат-форпола (РМА) (Сигма, стандартное обозначение: Р8139) и 5 мкг/мл фитогемагглютинина (РНА-Р) (Сигма, стандартное обозначение: 1.8754), при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение 24 часов.

К адгезивным клеткам снова добавляют 100 мл среды RPM1, дополненной как описано выше, дополнительно включающей 10 нг/мл РМА и 5 мкг/мл РНА-Р. Клетки инкубируют при 37°C в присутствии 5% (по объему) CO₂ в течение 5 часов.

Остаток суспензии клеток, называемый ниже полными (целыми) клетками, распределяют в четыре большие квадратные чашки для культивирования и инкубируют в присутствии среды RPM1, дополненной как описано выше, к которой добавлено 10 нг/мл РМА и 5 мкг/мл РНА-Р, при 37°C в присутствии 5% (по объему) CO₂ в течение 5 часов для первых двух чашек и 24 часов для двух других чашек.

Примерно за 2 часа до окончания инкубации, в культуральную среду этих различных клеток добавляют 10 мкг/мл циклогексимида (Сигма, стандартное обозначение С6255) (ингибитор трансляции, который повышает стабильность РНК цитокинов: см. Lindsten и др., 1989, Science 244, 339-344) и инкубацию продолжают в течение 2 часов при 37°C.

2) Получение информационной (матричной) РНК:

а) Извлечение информационной РНК:

Клетки рекуперировать следующим образом:

- адгезивные (прилипшие) клетки промывают 2 раза буфером ЗФР (забуференный фосфатом физиологический раствор, стандартное обозначение 041040040 - Гибко BRL), затем соскребают с помощью скребка из каучука и центрифугируют. Таким образом получают осадок клеток, называемый осадок А;

- для неадгезивных клеток, после перемешивания в колбе, содержащей суспензию клеток, суспензию клеток отбирают и центрифугируют. Таким образом получают осадок клеток, называемых осадком клеток НА;

- для полных клеток, адгезивную фракцию промывают 2 раза буфером ЗФР и соскребают как описано выше, затем центрифугируют. Неадгезивную фракцию центрифугируют. Два полученных осадка клеток впоследствии объединяют. Их объединение называют осадком клеток Т (5 часов) для полных клеток, инкубированных в течение 5 часов, и Т (24 часа) для полных клеток, инкубированных в течение 24 часов.

Осадок клеток А, ПА, Т(5 часов) и Т (24 часа) замораживают и хранят при -80°C.

Каждый замороженный осадок клеток суспендируют в лизисном буфере следующего состава: 5 моль тиоцианата гуанидина; 50 ммоль трис-(гидроксиметил) аминотетана, pH = 7,5; 10 ммоль ЭДТК. Суспензию обрабатывают ультразвуком с помощью ультразвукового дегинтегратора Ultra Turax № 231 256 (Janke и Kunkel) с максимальной мощностью в течение 4-х циклов по 20 секунд. Добавляют β-меркаптоэтанол до 0,2 моль и снова осуществляют цикл обработки ультразвуком в течение 30 секунд. Добавляют хлорид лития вплоть до 3 моль. Суспензию охлаждают до 4°C и оставляют стоять при этой температуре в течение 48 часов. РНК затем выделяют путем центрифугирования в течение 60 минут. Осадок РНК промывают один раз с помощью 3М раствора хлорида лития, снова центрифугируют, затем обрабатывают буфером следующего состава: 1% додецилсульфата натрия, 5 ммоль ЭДТК и 10 ммоль Трис-НСl, pH = 7,5, с добавлением 1 мг/мл протеиназы К (Boehringer, Маннхайм, Гмбх). После инкубации при 40°C в течение 1 часа, раствор РНК экстрагируют с помощью смеси фенола с хлороформом. При -20 °C содержащуюся в водной фазе РНК осаждают с помощью 0,3 М раствора ацетат аммония и 2,5 объемов этанола. Центрифугируют при 15 000 g в течение 30 минут и осадок хранят.

б) Очистка фракции поли А⁺ РНК

Осадок обрабатывают с помощью 1 мл буфера состава Трис-НСl, 10 ммоль, pH=7,5, и ЭДТК, 1 ммоль, называемого буфер ТЕ, и суспендируют путем перемешивания с помощью вихревой мешалки. Олиго-dT-целлюлозу типа 3 (выпускаемая в продажу Collaborative Research, Inc., Biomedicals Product Division) готовят согласно рекомендациям изготовителя. РНК помещают на олиго-dT-целлюлозу, осторожно перемешивают для суспендирования шариков, затем нагревают в течение 1 минуты при 60°C.

Суспензию дополняют с помощью 0,5 моль NaCl, затем осторожно перемешивают в течение 10 минут. После этого суспензию центрифугируют в течение 1 минуты при 1000 g, супернатант удаляют, осадок промывают 2 раза по 1 мл буфера ТЕ, содержащего 0,5 моль NaCl. Супернатанты удаляют. Элюирования полиаденилированной фракции РНК (состоящей из информационных РНК) достигают путем суспендирования шариков в 1 мл буфера ТЕ, затем нагревания этой суспензии при 60°C в течение 1 минуты, с последующим перемешиванием в течение 10 минут на встряхивателе. Затем центрифугируют в течение 1 минуты при 1000 g, что позволяет рекуперировать супернатант, содержащий свободные информационные РНК в растворе. Совокупность вышеуказанных операций (начиная с элюирования) повторяют 2 раза. Таким образом полученные супернатанты объединяют, удаляют остаточные шарики путем центрифугирования и супернатант осаждают с помощью 3 объемов этанола и раствора NaCl с конечной концентрацией 0,3 моль.

Таким образом из осадков клеток А, НА, Т(5 часов) и Т(24 часа) получают четыре образца РНК - А⁺, называемые далее как РНК-polyA⁺-А; РНК-polyA⁺-НА; РНК polyA⁺ И (5 час.) и РНК- polyA⁺ - Т(24 час).

РАЗДЕЛ 2:

Получение банка комплементарной ДНК, обогащенного специфическими последовательностями мононуклеарных клеток периферической крови

1) Конструирование клонирующего вектора pSE1:

В используемой стратегии прибегают к использованию фрагментов, получаемых из общедоступных плазмид, и фрагментов, получаемых путем синтеза по обычно используемым в настоящее время методам. Применяемые способы клонирования представляют собой такие, которые описаны Sambrook и др., в "Molecular Cloning, a Laboratory manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, 1989). Синтез олигонуклеотидов осуществляют с помощью синтезатора РНК - Biosearch 8700.

Нижеприводимое описание для лучшего понимания иллюстрируется рисунком 1а.

Эту плазмиду конструируют путем последовательных лигирований следующих элементов:

- а) фрагмент PvuII - PvuII, обозначаемый ++++++ на фиг. 1а, из 2525 пар оснований, получают путем переваривания плазмиды pTZ18R (Фармация) ферментом рестрикции PvuII. Этот фрагмент содержит источник репликации фага Ι (обозначаемый на фиг. 1а как ORIF1), ген (обозначаемый на

фиг. 1а как Amp^R); обладающий резистентностью к ампициллину, и источник репликации (обозначаемый на рисунке 1а как ORI pBR322), позволяющий осуществлять репликацию этой плазмиды в *E. coli*. Первый свободный сайт PvuN исчезает за счет лигирования со свободным сайтом EcoRV (который также исчезает) фрагмента, описанного в п. ж);

б) фрагмент PvuN - HpaI - обозначаемый на фиг. 1а - из 1060 пар оснований ДНК аденовируса типа 5 между положениями 11299 (сайт рестрикции PvuN) и 10239 (сайт рестрикции HpaI) (Bekker и Van Omond, Gene, 21, 1984, 115-120), содержащий информацию для РНК VA-1 и VA- II. Свободный сайт HpaI исчезает за счет лигирования со свободным сайтом PvuII (который также исчезает) фрагмента, описанного в в. Сайт ApaI в положении 11218 удаляют путем расщепления с помощью фермента ApaI, обработки с помощью экзонуклеазы: ДНК-полимеразы фага T4 и нового лигирования;

в) фрагмент PvuN - Hind III - обозначаемый на фиг. 1а - из 344 пар оснований, происходящий от ДНК вируса SV40, получаемый путем переваривания с помощью ферментов рестрикции PvuN и Hind III. Этот фрагмент включает источник репликации и ранний промотор ДНК вируса SV40 (B.J. Byrne и др. Proc. Natl. Acad. Sci. США (1983), 80, 721-725).

Сайт Hind III исчезает за счет лигирования с сайтом связывания Hind III, описанным в п.г).

г) синтетический фрагмент "сайт связывания Hind III - Hind III - обозначаемый на фиг. 1а как ===== - из 419 пар оснований, последовательность которого, представленная на фиг. 1б, содержит последовательность, близкую к непереработанной s - последовательности вируса HTLV1 (R. Weiss и др. "Molecular Biology of Tumor Viruses - часть 2, 2-е издание, 1985 Cold Spring Harbor Laboratory, с. 1057), и периферический интрон гена α -глобина мыши (Y. Nishioka и др. 1979, Cell., 18, 875-882);

д) синтетический фрагмент Hind III - "сайт связывания BamHI" - обозначаемый как XXXXXXX на фиг. 1а -, содержащий промотор РНК-полимеразы фага T7, также, как полилинкер, содержащий особенно сайты клонирования ApaI и BamHI, последовательность которого представлена на рисунке 1в;

е) фрагмент BamHI - BclI из 240 пар оснований - обозначаемый на фиг. 1а -, маленький фрагмент, получаемый путем переваривания ферментами BclI и BamHI вируса SV 40, которые содержат сайт его полиаденилирования (M. Fitzgerald и др., Cell, 24, 1981, 251-260). Сайты BamHI и BclI исчезают за счет лигирования соответственно с "сайтом связывания BamHI" фрагмента, описанного в п.д.), и сайтом BamHI (который также исчезает) фрагмента, описанного в п. ж);

ж) фрагмент BamHI - EcoRV - обозначаемый как oooooo на фиг. 1а - из 190 пар оснований, маленький фрагмент, происходящий от плазмиды pBR322 после полного переваривания ферментами EcoRV и BamHI.

Плазмида pSEI, следовательно, включает элементы, необходимые для ее использования в качестве клонирующего вектора в *E. coli* (источник репли-

кации в *E. coli* и ген устойчивости к ампициллину, происходящий от плазмиды pTZ18P), также как в качестве вектора экспрессии в клетках животных (промотор, интрон, сайт полиаденилирования, источник репликации вируса SV40) и для ее копирования в виде простой нити с целью секвенирования (источник репликации фага ϕ 1).

2) Конструирование банка комплементарной ДНК, обогащенного специфическими последовательностями мононуклеарных клеток периферической крови:

Используемым способом клонирования, описан Carut и др., (способ праймер-адаптер): Carut и др. pROC. Natl. Acad. Sci. США, 1986, 83, 1670-1674.

Он состоит, с одной стороны, в ферментативном гидролизе вектора pSEI с помощью ApaI, добавления "хвоста polydC к прогуберантному 3'-концу, затем в ферментативном гидролизе таким образом полученных плазмид с помощью эндонуклеазы Bam HI. Соответствующий вектору фрагмент очищают на колонке с сефарозой C1AB (Фармация). Следовательно, он включает "хвост" polydc на одном конце, причем другой конец является когезивным, типа Bam HI.

С другой стороны, полученные в конечном итоге раздела 1 РНК-poly A⁺ подвергают обратной транскрипции, исходя из праймера, последовательность которого следующая:

5' < GATCCGGGCCCTTTTTTTT TTT < 3'.

Так, кДНК содержат на своем 5' - конце последовательность GATCC, комплементарную когезивному концу BamHI.

Гибридные РНК-ДНК, получаемые путем воздействия обратной транскриптазы, подвергают щелочному гидролизу, который позволяет удалить РНК. Однонитевые кДНК затем подвергают обработке терминальной трансферазой, чтобы добавить в 3' polyd G-, и очищают с помощью двух циклов пропускания через колонку с сефарозой CL4B.

Эти кДНК гибридизируют с РНК-poly A⁺, происходящей из клеток линии COS3 (линия клеток обезьяньих почек, экспримирующих антиген Т вируса SV40: см. Gluzman, 1981, Cell., 23, 175-182), получаемых как описано в Разделе 12).

Негибридизованные кДНК выделяют (фракция, обогащенная ДНК, комплементарной информационным специфическим РНК мононуклеарных клеток периферической крови).

Эти кДНК в однонитевой форме вставляют в вектор pS E1. Второй олигонуклеотид (адаптер), комплементарный праймеру, для генерации требует сайта BamHI на 5'-конце кДНК. После гибридизации вектора, кДНК и адаптера, рекомбинантные молекулы циркуляризируют путем воздействия лигазы фага T4. Однонитевые участки тогда укрепляют благодаря ДНК-полимеразе фага T4. Таким образом полученный пул плазмид служит для трансформации штамма *E. coli* MC 1061 (Casabadan, S. Cohen, J. Vast, (1980), 143, 971-980) путем электропорации.

Протокол получения банка комплементарной ДНК

а) Получение комплементарной ДНК

Из 5 мкг РНК-polyA⁺ мононуклеарных клеток периферической крови, полученных в итоге Раздела 1, следующего состава:

РНК-polyA⁺ А: 0,5 мкг; РНК-polyA⁺ NA: 2 мкг; РНК-polyA⁺ Т (5 час): 2 мкг; и РНК-polyA⁺ Т (24 час): 0,5 мкг, получают комплементарную однонитевую ДНК, маркированную 32p-dCTP (полученная комплементарная ДНК имеет удельную активность 3000 импульсов в мин/нг), с помощью синтетического праймера со следующей последовательностью (включающий сайт BamHI):

5' GATCCGGGCC CTTTCTTTT TTT 3'

в объеме 100 мкл буфера состава: 50 ммоль Трис-HCl, pH = 8,3; 5 ммоль хлорида магния; 10 ммоль дитиотрентола, содержащего по 0,5 ммоль каждого из дезоксинуклеотидтрифосфатов, 100 микроюри dCTP α32p и 100 ед. Pnasin (Промега). После инкубации в течение 30 минут при 46 °C со 100 единицами фермента обратной транскриптазы Genofit -E1 022), добавляют 4 мл 0,5 М ЭДТК. Первый раз экстрагируют фенолом (насыщенный буфером ТЕ), затем во второй раз экстрагируют хлороформом. Добавляют 10 мкг транспортной РНК телячьей печени, 1/10 объема 10 М раствора ацетата аммония и 2,5 объема этанола для осаждения комплементарной ДНК. Центрифугируют, осадок после центрифугирования растворяют в 30 мкл буфера ТЕ, затем удаляют маленькие молекулы, такие, как соли, фенол и хлороформ, путем эксклюзивной хроматографии на колонке с полиакриламидом Р10 (Биогель Р 10; 200-400 меш; стандартное обозначение: 1501050; Биора).

б) Щелочной гидролиз матричной РНК

Добавляют 4,6 мкл 2 н раствора гидроксида натрия, инкубируют в течение 30 минут при 68°C, затем добавляют 4,6 мкл 2н уксусной кислоты и полученный раствор пропускают через колонку с полиакриламидом Р10.

в) Гомополимерное присоединение dG

Удлиняют комплементарную ДНК по 3'-концу с помощью "хвоста" dG с 66 единицами концевого фермента трансферазы (Фармация; 27073001). Инкубируют в 60 мкл буфера следующего состава: 30 ммоль Трис-HCl, pH=7,6; 1 ммоль хлорида кобальта; 140 ммоль каодиновой кислоты; 0,1 ммоль дитиотрентола, 1 ммоль dGTP; в течение 30 минут при 37°C, затем добавляют 4 мкл 0,5 М ЭДТК.

г) Очистка на колонке с сефарозой CL4B

Для того, чтобы удалить синтетический праймер, комплементарную ДНК очищают на двух последовательных колонках с 1 мл сефарозы CL4B (Фармация), уравновешенных с раствором, содержащим 30 ммоль гидроксида натрия на 2 ммоль ЭДТК.

Первые три радиоактивные фракции (около 80 мкл каждая) объединяют и осаждают с помощью 1/10 объема 10 М раствора ацетата аммония и 2,5

объема этанола. Количество комплементарной ДНК составляет 1 мкг.

д) Гибридизация

Осадок комплементарной ДНК суспендируют в 25 мкл буфера ТЕ, добавляют 15 мкг РНК-polyA⁺, извлеченной из клеток линии COS, затем 0,1 объема 3М раствора хлорида натрия, 2,5 объема этанола и оставляют осаждаться при -20°C.

Центрифугируют, промывают 70%-ным этанолом, высушивают, осадок растворяют в 5 мкл буфера следующего состава: 0,1 моль Трис-HCl, pH = 7,5; 0,3 моль хлорида натрия; 1 ммоль ЭДТК; полученный раствор помещают в капиллярную трубку, которую герметически закрывают (запаивают), затем инкубируют при 65°C в течение 40 часов.

Содержимое капилляра разбавляют с помощью 100 мкл буфера ТЕ, к которому добавляют 300 мкл 50 mM натрийфосфатного буфера, pH=6,8. Полученный раствор пропускают через колонку с гидроксипатитом (Биора; стандартное обозначение: 130.0520) при 60 °C, уравновешенным с этим фосфатным буфером. Выделяют простую (одинарную) нить (комплементарная негибризованная ДНК) и двойную нить (информационная РНК COS / гибризованная с комплементарной ДНК) с помощью градиента 0,1 М -0,2 М фосфатного буфера при пропускании через колонку с гидроксипатитом. Объединяют соответствующие фракции с однонитевой комплементарной ДНК (25% масс, элюированной кДНК, что соответствует обогащению примерно в 4 раза специфическими последовательностями мононуклеарных клеток периферической крови), добавляют 20 мкг транспортной РНК, весь полный объем осаждают с помощью 0,1 объема 10 М раствора ацетата аммония и 2,5 объема этанола. Центрифугируют, осадок после центрифугирования растворяют в 200 мкл ТЕ, остаточный фосфат удаляют на полиакриламиде Р 10, снова осаждают с помощью 0,1 объема 10 М раствора ацетата аммония и 2,5 объема этанола.

Осадок растворяют в 30 мкл раствора с 30 ммоль NaOH /2 ммоль ЭДТК. Комплементарную ДНК загружают в колонку с, сефарозой CL4B (Фармация) объемом 1 мл, уравновешенной с раствором, содержащим 30 ммоль NaOH/ 2 ммоль ЭДТК, чтобы удалить остаток синтетического праймера. Объединяют первые три радиоактивные фракции объемом около 80 мкл каждая. Содержащуюся в этих фракциях кДНК осаждают с помощью 0,1 объема 10 М раствора ацетата аммония и 2,5 объема этанола. Таким образом полученное количество комплементарной ДНК составляет 20 нг.

е) Конъюгация клонирующего вектора PSEI и комплементарной ДНК в присутствии алантера

Центрифугируют, осадок растворяют в 33 мкл буфера ТЕ, добавляют 5 мкл (125 нг) клонирующего вектора pSEI, 1 мкл (120 нг) алантера со следующей последовательностью (включающий сайт ApaI):

5' AAAAAAAAAA AAAGGGCCCG 3'.

10 мкл 200 мМ раствора хлорида натрия, инкубируют в течение 5 минут при 65 °С, затем реакционную смесь оставляют охлаждаться до комнатной температуры.

ж) Лигирование

Клонировующий вектор и однонитевую кДНК лигируют в объеме 100 мкл с 32,5 единицами фермента ДНК-лигазы фага Т4 (Фармация; стандартное обозначение: 27087002) в течение ночи при 15°С в буфере следующего состава: 50 ммоль Трис-НСl, рН=7,5; 10 ммоль хлорида магния, 1 ммоль аденозин-5'-трифосфата.

з) Синтез второй нити кДНК

Протеины удаляют путем экстракции фенолом с последующей экстракцией хлороформом, затем добавляют 0,1 объема 10 мМ раствора ацетата аммония, потом 2,5 объема этанола. Центрифугируют, осадок растворяют в буфере следующего состава: 33 ммоль Трис-ацетата, рН=7,9; 62,5 ммоль ацетата калия, 1 ммоль ацетата магния и 1 ммоль дитиотрептола (ДТТ); вторую нить комплементарной ДНК синтезируют в объеме 30 мкл с 30 единицами фермента ДНК-полимеразы фага Т4 (Фармация; стандартное обозначение: 27-0718) и смесью по 1 ммоль четырех дезоксинуклеотидтрифосфатов dATP, dCTP, dGTP и dTTP, также, как с двумя единицами протеина гена 32 фага Т4 (Фармация; стандартное обозначение: 27-0213), в течение 1 часа при 37°С. Экстрагируют фенолом и следы фенола удаляют при использовании колонки с полиакриламидом Р 10 (Биогель Р 10; 200-400 меш; стандартное обозначение: 15011050, Биорад).

и) Трансформация путем электропорации

Клетки *E.coli* MC1061 (Сiontech) трансформируют при помощи вышеполученной рекомбинантной ДНК путем электропорации с помощью аппарата Biorad Gene Pulser (БИОРАД) на 2,5 киловольт в предписываемых изготовителем условиях, затем выращивают бактерии в течение 1 часа в так называемой среде LB Sambrook, цитировано выше) следующего состава: бактотриптон, 10 г/л; дрожжевой экстракт, 5 г/л; NaCl, 10 г/л; затем в течение 6,5 часов в среде LB, к которой добавлено 100 мкг/мл ампициллина.

Определено число независимых клонов путем внесения в разбавлении 1/1000 среды для трансформации после первого часа инкубации в чашку со средой LB, к которой добавлено 1,5% (вес/объем) агара и 100 мкг/мл ампициллина, называемой впоследствии агаровой LB средой. Число независимых клонов составляет 500 000.

РАЗДЕЛ 3:

Просеивание выделенного банка комплементарной ДНК и отбор клона NC30

1) Реализация реплик бактериальных колоний банка кДНК на нейлоновом фильтре

Примерно 40 000 рекомбинантных бактерий банка кДНК распределяют по чашкам Петри (245 x 245 мм), содержащим агаровую среду LB (около 2 000 колоний на чашку).

Из каждой из этих чашек осуществляют перенос колоний на нейлоновую мембрану (Hybond N - Америкс) путем помещения мембраны на поверхность чашки и ставят метки путем прокалывания мембраны с помощью иглы. Мембрану затем удаляют и помещают на поверхность новой чашки Петри, содержащей агаровую среду LB. Оставляют на несколько часов при 37°С, чтобы подучить вырост колоний. Из этой первой мембраны реализуют четыре реплики на новых мембранах (предварительно помещенных на агаровую среду LB для их увлажнения) путем последовательных контактов с первой мембраной. Полученные на мембране реплики, наконец, помещают на чашки с агаровой средой LB и инкубируют в течение ночи при 30°С.

Реплики на мембране с колониями кверху помещают на лист ватмана 3ММ, насыщенный раствором состава, 0,5 моль NaOH, 1,5 моль NaCl; на 5 минут, что позволяет лизировать бактерии и фиксировать ДНК. Реплики на мембране затем помещают на второй лист ватмана 3 мМ, насыщенный на этот раз нейтрализующим раствором состава, 1,5 М NaCl; 5 М Трис-НСl, рН=8,0; на 5 минут. Реплики на мембране затем погружают в раствор 2 x SSC (состав раствора SS C:0,15 М NaCl; 0,015 М цитрата натрия) и остатки бактерий частично удаляют, осторожно протирая (соскребывая) с помощью ваты для очистки.

Затем реплики (отпечатки) на мембране обрабатывают протеиназой К (Boehringer Mannheim GmbH) в концентрации 100 мкг/мл в растворе следующего состава: 10 ммоль Трис-НСl, рН = 8; 10 ммоль ЭДТК; 50 ммоль NaCl; 0,1% додецилсульфата натрия; по 20 мл на мембрану. Инкубируют в течение 30 минут при 37°С и при перемешивании. Реплики на мембране снова погружают в раствор 2x SSC для окончательного удаления всех следов остатков бактерий. Наконец, их высушивают на фильтровальной бумаге в течение нескольких минут, затем в течение 30 минут в вакууме при +80°С. Таким образом, на каждую чашку получают 4 реплики на мембране, называемые впоследствии реплика 1, реплика 2, реплика 3 и реплика 4.

2) Получение РНК, используемой для конструирования зондов кДНК:

а) Культивирование и стимулирование мононуклеарных клеток периферической крови с помощью РМА, (РМА и анти-С£28), (РМА, РНА-Р и циклоспорин А) или (РМА и РНА-Р):

Неадгезивные клетки получают как описано выше (раздел 1.1). Их культивируют в течение 5 часов в колбах типа Falcon с поверхностью 175 см² в присутствии среды RPMI, дополненной 10% плодной телячьей сыворотки (Гибко BRL - стандартное обозначение: 013-06290H), с добавлением 10 единиц пенициллина и 10 мкг стрептомицина (раствор пенициллина/стрептомицина Гибко; стандартное обозначение: 043-05140) на 1 мл среды, также, как L-глутамин (Гибко BRL - стандартное обозначение: 043-05030) вплоть до конечной концентрации 2 ммоль. Клетки стимулируют в течение 5 часов при

одном из следующих условиях стимуляции 1), 2), 3) и 4):

1) в присутствии 10 нг/мл 2-миристат-3-ацетат-форбола (PMA) (Сигма, стандартное обозначение: P8139);

2) в присутствии 10 нг/мл PMA и 1 мкг/мл моноклонального анти-CD8-28- антитела (Reactifs и Systems S.A., стандартное обозначение: ACM0280HCOS0);

3) в присутствии 10 нг/мл PMA, 5 мкг/мл фитогемагглютинаина (PHA-P) (Сигма; стандартное обозначение: 1.8754) и 1 мкг/мл циклоспорина А (Сандоз);

4) в присутствии 10 нг/мл PMA и 5 мкг/мл PHA-P.

В самом деле, известно, что добавление анти-CD28-антитела увеличивает количество информационной РНК некоторых цитокинов, особенно IL-2, IFN, α -TNF и GM-CSF, за счет повышения стабильности их информационных РНК (Lindsten T. и др. (1989), Science, 244, 339) в Т-лимфоцитах, и что иммуносупрессор циклоспорин А ингибирует увеличение информационных РНК цитокинов, индуцируемых путем активации с помощью PMA и PHA-P в Т-лимфоцитах (Thompson C.B. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. США, 86, 1333-1337).

Клетки собирают в вышеуказанных условиях стимулирования и сохраняют осадки клеток, называемые, соответственно, осадок клеток 1, осадок клеток 2, осадок клеток 3 и осадок клеток 4.

б) Получение РНК-poly A⁺

Из вышеуказанных осадков клеток экстрагируют РНК и фракцию polyA⁺ очищают как описано в разделе 1-2) а) и б). Таким образом получают четыре фракции РНК-poly A⁺, называемые, соответственно, фракция polyA⁺1, фракция polyA⁺2, фракция polyA⁺3 и фракция polyA⁺4.

3) Получение радиомаркированных зондов кДНК:

Радиомаркированные (меченые радиоактивным изотопом) зонды кДНК, называемые, соответственно, зонд 1, зонд 2, зонд 3 и зонд 4, синтезируют из четырех вышеуказанных фракций РНК-polyA⁺, подготовляемых как описывается ниже: 1 мкг РНК-polyA⁺ гибридизируют с 200 нг олиго-dT₂₂₋₁₈ (Фармация) в 2-3 мкл буфера следующего состава: 50 ммоль Трис-НСl, pH=7,5; и 1 ммоль ЭДТК; путем инкубации в течение 2 минут при 65°C и охлаждения вплоть до комнатной температуры. Синтез радиомаркированной кДНК осуществляют в реакционном объеме 10 мкл буфера следующего состава: 50 ммоль Трис-НСl, pH=8,3; 5 ммоль MgCl₂; 10 ммоль дитиотрейтола, содержащего по 500 мкмоль каждого из трех дезоксирибонуклеотидтрифосфатов dATP, dCTP и dGTP (Фармация), 10 мкмоль dCTP и 150 микрокюри α -32 P-dCTP (3000 кюри на ммоль; Америкхам) и 40 единиц RNase (ингибитор RNase, Genofit). Реакцию осуществляют при 46°C в течение 30 минут в присутствии 10-20 единиц обратной транскриптазы (Genofit). За этим синтезом следует щелочной гидро-

лиз РНК с помощью 0,3 М раствора NaOH в конечном объеме 20 мкл в течение 30 минут при 65°C. Нейтрализуют путем добавления 3М уксусной кислоты. Доводят объем до 50 мкл с помощью среды TE. Проводят экстракцию таким же объемом фенола с последующей второй экстракцией таким же объемом смеси хлороформа с изоамиловым спиртом в соответствующих пропорциях 24/1. α 32-P-dCTP, не включившийся во время синтеза нити кДНК, удаляют путем эксклюзионной хроматографии на колонке с полиакриламидом P10 (Биогель; 200-400 меш; Биорад).

Количество кДНК составляет 60-100 пг, с удельной активностью 1×10^9 импульсов в минуту/мкг.

4) Гибридизация реплик колоний бактерий с зондами кДНК:

Реплики на мембране предварительно гибридизуют в течение 2 часов при 42°C в буфере следующего состава: 50% формамида, 6 x SSC; 5 x раствор Denhardt; 0,1% додецилсульфата натрия и 100 мкг/мл ДНК подвергнутой обработке ультразвуком спермы лосося, добавляемой после денатурации в течение 10 минут при 100°C. Реплики на мембране гибридизуют в течение двух дней: реплику 1 с зондом 1, реплику 2 с зондом 2, реплику 3 с зондом 3 и реплику 4 с зондом 4, причем эти зонды используют в концентрации 4 нг/мл в вышеуказанном буфере. 5 x Раствор Denhardt (см. Sambrook, цитировано выше) имеет следующий состав: 1 г/л Ficoll (тип 400; Фармация); поливинилпирролидон, 1 г/л; и 1 г/л бычьего сывороточного альбумина (BSA).

Предварительную гибридизацию и гибридизацию осуществляют в пробирках в печи для гибридизации (Hybaid) соответственно, с 25 мл и 10 мл буфера на мембрану.

Затем реплики на мембране промывают последовательно несколько раз в течение 15 минут при 20°C в буфере состава: 2 x SSC; 0,1% додецилсульфата натрия; затем два раза в течение 15 минут в растворе 0,1 x SSC, 0,1% додецилсульфата натрия; при 55°C, после чего высушивают на бумаге Ватман 3ММ и подвергают рентгенографии на пленках Kodak XAR 5.

5) Гибридизация со смесью олигонуклеотидов, соответствующих большинству известных цитокинов:

Для идентификации клонов, которые содержат комплементарные информационным РНК ДНК известных цитокинов, другую серию реплик на мембране, полученных как описано выше, гибридизируют со смесью, называемой смесью С, из 28 олигонуклеотидов, включающих, каждый, 20 нуклеотидов, соответствующих комплементарным ДНК следующих цитокинов:

Интерлейкин-1 α (Furutani Y. и др., 1985, Nucl. Ac. Res., 13, 5869-5882), Интерлейкин-1 β (Auron P. и др., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 7907-7911), Интерлейкин-2 (Degrave W. и др., 1983, EMBO J., 2, 3249-3253), Интерлейкин-3 (Yang Y.C. и др., Cell, 1986, 47, 3-10), Интерлейкин-4 (Yokota T. и др., 1986,

Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 5894-5898), Интерлейкин-5 (Hirano T. и др., 1986, Nature, 324, 73-75), Интерлейкин-6 (May L.u др., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83, 8957-8961), Интерлейкин-7 (Namen A. и др., 1988, Nature, 333, 571-573), Интерлейкин-8 (Matsushima K. и др., 1988, J. Exp. Med., 167, 1883-1893), Интерлейкин-9 (Yang Y.C. и др., 1989, Blood, 74, 1880-1884), TNF α (Pennica D. и др., 1984, Nature, 312, 724-729), TNF β (Gray P. и др., 1984, Nature, 312, 721-724), GCSF (Nagata S. и др., 1986, Nature, 319, 415-418), MCSF (Kawasaki E. и др., 1985, Science, 230, 291-296), GM-CSF (Wong G.u др., 1985, Science, 228, 810-815), LIF (Gough N. и др., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2623-2627), Интерферон.

... и др., 1981, Nature, 290, 20-26), Интерферон- β (Taniguchi T. и др., 1980, Gene, 10, 11-15), Интерферон- γ (Gray P. и др., 1982, Nature, 295, 503-508), TGF α (Derynck R. и др., 1984, Cell, 38, 287-297), TGF β 1 (Derynck R. и др., 1985, Nature, 316, 701-705), bFGF (Prats H. и др., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1836-1840), Эритропоэтин (Jacobs K. и др., 1985, Nature, 313, 806-810), BCGF (Sharma S. и др., 1987, Science, 235, 1489-1492), MIF (Weiser W. и др., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7522-7526), MCP-1, (Yoshimura T. и др., FEBS Lett., 244, 487-493), Онкостатин-M (Malik N. и др., 1989, Mol. Cell. Biol., 9, 2847-2853), EDF (Murata M. и др., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 2434-2438).

Эти олигонуклеотиды, полученные с помощью синтезатора ДНК Biscorh 8700, связывают с пероксидазой хрена EC 1.11.17 (Boehringer Mannheim; стандартное обозначение: 814-407) согласно следующему протоколу:

- в колонке для синтеза олигонуклеотида вводят во взаимодействие с карбонилдимидазолом (Oldrich - 11, 553 - 3) и 1,6- диаминогексаном (Oldrich - H 1. 169 - 6), согласно методу Wachter и др., 1986, Nucl. Ac. Res. 14, 7985 - 7994;

- после удаления защитных групп оснований и расщепления носителя путем обработки аммиаком, олигонуклеотиды очищают при использовании ионообменной смолы (Qiagen - Diagen - 500051) с обменом противоиона аммония на ион лития;

- 5' - аминокислоты олигонуклеотиды связывают с пероксидазой хрена (Boehringer Mannheim - 814 407) согласно методу M. Urdea и др., Nucl. Ac. Res., 1988, 16, 4937 - 4956.

Смесь олигонуклеотидов гибридизуется примерно с 10% клонов банка.

Клоны, дающие ауторентгенографический сигнал более сильный с зондом 2, чем с зондом 1, более сильный с зондом 4, чем с зондом 1, и более сильный с зондом 4, чем с зондом 3, и не гибридизирующиеся со смесью С, частично секвенированы как описывается в разделе 4 ниже. Два из этих клонов, называемых далее клонами NC30 и NC30-бис, таким образом сохраняются. Эти клоны содержат соответственно плазмиду, называемую pSE1-NC30, и плазмиду, называемую pSE1-NC30-бис.

РАЗДЕЛ 4:

Экспрессия информационной РНК клона NC-30 в мононуклеарных клетках периферической крови

Неадгезивные клетки (образованные в основном лимфоцитами) получают как описано в разделе 1-1) и стимулируют как описано в разделе 3-2)-а), кроме контрольных нестимулируемых клеток (условия стимулирования 0)). Информационные РНК этих клеток получают при 5 условиях стимулирования, как описано в примере 1-2)-а), и анализируют путем электрофореза на 1%-ном агарозном геле в присутствии формальдегида (Sambrook, цитировано выше) с последующим переносом на нейлоновую мембрану (Hyband N⁺; Америксхам) и гибридизацией согласно описанному выше протоколу.

Эту мембрану гибридизируют с радио-маркированным с помощью α -32p-dCTP зондом, получаемым из кДНК NC30 (Америксхам) путем частичного разреза этой последней с помощью ДНКse 1, с последующей полимеризацией с помощью фермента ДНК-полимеразы (так называемый метод "ник-трансляции" или смещения цезуры), как описывается Somnforck и др., цитировано выше. Гибридизацию проводят при 42 °C в течение 16 часов в водной среде, содержащей 50 % формамида 1 моль NaCl, раствор 5 x Denhard и 0,1% додецилсульфата натрия. Мембраны промывают несколько раз при комнатной температуре раствором 2 x SSC, содержащим 0,1% додецилсульфата натрия, затем промывают два раза при 50 °C в течение 15 минут с помощью раствора 0,1 xSSC, содержащего 0,1% додецилсульфата натрия. Раствор 5 x Denhard имеет следующий состав: 1 г/л Ficoll (тип 400; Фармация), 1 г/л поливинилпирролидона и 1 г/л бычьего сывороточного альбумина. Раствор 1 x SSC содержит 0,15 моль NaCl и 0,015 моль цитрата натрия.

Для нестимулированных клеток и для клеток, стимулированных в условиях 1), 2), 3) и 4), устанавливают ауторадиографическую полосу, соответствующую РНК длиной примерно 1,4 т.п.н. (тысячи пар нуклеотидов). Экспрессия этой РНК увеличивается в присутствии РМА (полоса интенсивности по крайней мере, в 5 раз сильнее для условия стимулирования 1), чем для условия стимулирования 0)), причем это увеличение усиливается с дополнительным присутствием РНА-Р или анти-CD28 (полосы интенсивности примерно в 5 раз сильнее для условий стимулирования 2) и 4), чем для условия стимулирования 1)) и не изменяется с дополнительным присутствием РНА-Р и циклоспорина (полосы интенсивности подобны таковым для условий стимулирования 1) и 3)).

Также в другом эксперименте, осуществляемом с популяцией очищенных Т-лимфоцитов (до чистоты выше 95%), устанавливают экспрессию информационной РНК NC30 после совместной стимуляции с помощью РМА и анти-CD28.

РАЗДЕЛ 5:

Секвенирование и анализ последовательности кДНК клона NC30

1) Секвенирование кДНК клона NC-30:

а) Получение однокитевой ДНК:

Клон NC30 содержит вектор pSE1, который включает кДНК между сайтами *ApaI* и *BamHI*, называемый впоследствии кДНК - NC30.

Вектор pSE1, который содержит источник репликации фага f1, позволяет продуцировать однокитевую ДНК путем культивирования клона NC30 в присутствии бактериофага M13K07 (Фармация; стандартное обозначение, 27-1527), следующим образом:

- Клон NC-30 культивируют в пробирке емкостью 15 мл при перемешивании и при 37°C в 2 мл среды 2 x YT состава: 16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л хлорида натрия (описано Sambrook и др., цитировано выше), дополненной 0,001% тиамина и 100 мкг/мл ампициллина до оптической плотности при 660 нм около 0.60.

- 100 мкл этой культуры инфицируют с помощью бактериофага M13K07 (Фармация; стандартное обозначение: 27-1524) с мультиплетностью инфекции порядка 10, в пробирке емкостью 15 мл. Культуру перемешивают при 37°C.

- По истечении 1 часа, добавляют 2 мл среды. Культуру тогда инкубируют в течение примерно 16 часов при 37°C и при перемешивании.

- 1,5 мл Культуры центрифугируют, в микропробирке, в течение 2 минут при 15 000 g.

- 1 мл Супернатанта переносят в микропробирку и добавляют 250 мкл 20 %-ного раствора полиэтиленгликоля с молекулярной массой 6000, содержащего 2,5 моль NaCl. Смесь инкубируют в течение 5 минут при 4 °C для облегчения осаждения фага, затем центрифугируют в течение 5 минут при 15 000 с. Супернатант удаляют и осадок фага снова суспендируют в 500 мкл буфера состава: 10 ммоль Трис-HCl, pH=8; 1 ммоль ЭДТК.

- Суспензию экстрагируют один раз фенолом, насыщенным 100 ммоль Трис-HCl, pH=8, затем два раза хлороформом.

- Препарат затем осаждают путем добавления 1/10 объема 3М раствора ацетата натрия, pH = 4,8, и 2,5 объема этанола. Осаждение осуществляют при -20°C в течение минимально 20 минут. ДНК отделяют путем центрифугирования в течение 10 минут при 15 000 о, осадок после центрифугирования промывают 70%-ным раствором этанола, затем снова суспендируют в 30 мкл буфера состава: 10 ммоль Трис-HCl, 1 ммоль ЭДТК.

б) Секвенирование

Реакции секвенирования осуществляют с помощью набора для секвенирования United States Biochemical (стандартное обозначение: 70770), используя метод Sanger и др. Proc. Natl. Acad. Sci., США, 1977, 14, 5463-5467. Используемыми праймерами являются олигонуклеотиды из 18 нуклеотидов, комплементарных или вектору pSE1 в области непо-

средственно у 5'-конца кДНК-NC30, или последовательности кДНК-NC30.

2) Анализ последовательности кДНК-NC30:

Нижеприводимое описание для лучшего понимания иллюстрируется рисунками 2, 3 и 4.

1) кДНК-NC30 включает 1282 нуклеотида и заканчивается последовательностью polyA.

2) Это число нуклеотидов согласуется с величиной соответствующей информационной РНК (около 1,4 т.п.н.) (см Раздел 4).

3) В положении 1264-1269 последовательности ААТААА, которая соответствует обобщающей типичной последовательности, описанной M. Birnstiel и др., 1985, Cell, 41, 349, имеется сигнал поднадеждирования. В положениях 855-861, 872-878, 1133-1139 и 1152-1158 находятся последовательности из 7 нуклеотидов: ТАТТТАТ, ТАТТТАА, ААТТТАТ и ТАТТТАА, содержащие последовательность АТТТА, соответствующую консенсусному элементу (звену) нестабильности АУУУА, описанному G. Shaw и др., 1986, Cell, 46, 659-667. Комплементарная ДНК большинства известных цитокинов имеет последовательность, соответствующую этому консенсусному элементу нестабильности.

4) Последовательность ДНК включает открытую рамку считывания для трансляции протенна из АТГ в положении 15 - 17 вплоть до ТГА в положении 453 - 455, которое соответствует герминирующему трансляцию кодону. В этой рамке считывания имеются два кодона АТГ в положениях 15 - 17 и 57 - 59, способные инициировать трансляцию, соответствующие преобразованным протеннам из 146 и 132 аминокислот. Из них нуклеотидное окружение АТГ в положениях 57-59 представляет собой такое, которое более всего приближается к обобщающей типичной последовательности, описанной Kozak M., 1978, Cell, 15, 1109-1123, для инициирования трансляции в эукариотных клетках.

5) Программное обеспечение поиска сигнального пептида, называемое ниже программное обеспечение PS, разработано заявителем по методу и сведениям, описанным Von Heijne, 1986, Nucl. Ac. Res., 14, 483-490. Это программное обеспечение (пакет программ) в этой рамке считывания предусматривает гидрофобную область, подобную сигнальному пептиду, и четыре вероятные сайта протеинового расщепления (гидролиза), в положениях 74-75 (между Thr и Thr), 86-87 (между Ala и Leu), 110-111 (между Ala и Ser) и 116-117 (между Pro и Gly). Предусматриваемый сигнальный пептид находится между одним из двух Met, способных инициировать трансляцию, и одним из этих четырех сайтов расщепления. Предусматриваемый зрелый протенн (преобразованный протенн, расщепленный по месту своего сигнального пептида) включает, следовательно, последовательность из 126, 122, 114 или 112 аминокислот.

Те же самые прогнозирования получают с помощью пакета программ (программного обеспече-

ния) UW GCG университета в Висконсине: Devereux и др., 1984, Nucl. Ac. Res. 12, 8711-8721- Версия: Поиск сигнального пептида по методу G. Neugebauer (ссылка приведена выше).

Сравнение с другими известными последовательностями

Уже известная пептидная последовательность, наиболее близкая к таковой последовательности из 112 аминокислот зрелого протенна, представляет собой последовательность протенна из 132 аминокислот, выведенную из кДНК протенна Р 600 мыши, описанную K. D. Brown и др., 1989, 7, J. Imm., 142, 679-687. Этот протенин экспрессируется (экспримируется) в подклассе Т-лимфоцитов мыши: клетки Th2, активированные с помощью конканавалина А.

Сравнение этих пептидных последовательностей с помощью метода Needleman и Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443-453, используемого в программном обеспечении UWGCG университета в Висконсине: Devereux и др., 1984, Nucl. Ac. Res., 12 8711-8721, версия GAP, показывает, что 63 аминокислоты из 112 идентичны, или гомология идентичности составляет около 56%. Этот алгоритмический метод учитывает все возможные согласования и позволяет создать согласованный ряд, представленный на рисунке 3, в котором как можно больше идентичных аминокислот подбирают под пары и число пропусков в согласованных последовательностях является минимальным.

Сравнение нуклеотидных последовательностей по этому методу показывает гомологию идентичности 70% между кодирующей последовательностью кДНК-NC30 и кДНК протенна Р 600 мыши (см. рисунок 4).

3) Секвенирование кДНК клона KC30-бис

Секвенирование, осуществляемое как описано выше в 1), позволяет обнаружить для кДНК клона NC30-бис такую же протениновую последовательность, как и для клона NC30, за исключением 75-той преобразованной аминокислоты, которая представляет собой Asp, кодируемую GAC, для клона NC30 и Gly, кодируемую GGC, для клона NC30-бис.

РАЗДЕЛ 6:

Анализ секреции в клетках COS протенна, кодируемого кДНК-NC30

Клетки COS представляют собой клетки обезьяньих почек, экспримирующие антиген Т вируса SV40 (Gluzman Y. Cell, 23, 1981, 175-182). Эти клетки, которые допускают репликацию векторов, содержащих источник репликации ДНК вируса SV 40 (случай вектора pSE1), представляют собой выбранных хозяев для исследования экспрессии генов в клетках животных.

1) Трансфекция клеток COS и транскрипционная экспрессия протенна, кодируемого кДНК-NC 30:

5×10^5 клеток COS высевают в чашку Петри диаметром 6 см (Corning) в 5 мл модифицированной по способу Дульбекко в среде Игла, ниже называемой ДМЕМ (Гибко; стандартное обозначение: 041-01965), которая содержит 0,6 г/л глутамина, 3,7 г/л

гидрокарбоната натрия и дополнена плодной телячьей сывороткой (Гибко) в количестве 5%. После культивирования в течение примерно 16 часов при 37°C в атмосфере, содержащей 5% диоксида углерода, культуральную среду удаляют путем отсасывания и клетки промывают 3 мл буфера ЗФР (забуференный фосфатом физиологический раствор; Гибко). После этого к ним добавляют следующую смесь: 1000 мкл из (ДМЕМ + 10% плодной телячьей сыворотки (Гибко)), 110 мкл диэтиламиноэтилдекстрана со средней молекулярной массой 500 000 (Фармация) при концентрации 2 мг/мл, 1,1 мкл 100 мМ Хлороквина (Сигма) и 6 мкг плазмидной ДНК клона NC30, полученной по способу щелочного лизиса с последующей очисткой плазмидной ДНК при использовании градиента хлорида цезия (Sambrook и др., цитировано выше). После инкубации в течение 5 часов при 37°C в атмосфере, содержащей 5% диоксида углерода, смесь удаляют от клеток. После этого к ним добавляют 2 мл буфера ЗФР, содержащего 10% диметилсульфоксида (качества "для спектроскопии"; Мерк). После инкубации в течение 1 минуты при комнатной температуре, смесь удаляют и клетки промывают два раза с помощью ЗФР и инкубируют в среде ДМЕМ, содержащей 2% плодной телячьей сыворотки. Инкубацию продолжают в течение 40 часов при 37°C в атмосфере, содержащей 5% диоксида углерода.

С другой стороны, подготавливают контрольные клетки COS, осуществляя вышеописанные операции с ДНК плазмиды pSE1.

2) Маркировка протеннов

Совокупность вышеописанных операций осуществляют с клетками COS, трансфектированными плазмидной ДНК клона NC30, и с клетками COS, которые являются контрольными.

Культуральную среду удаляют путем отсасывания и клетки промывают два раза по 3 мл буфера ЗФР. Добавляют 5 мл среды MEM (минимальная поддерживающая среда Игла) без метионина (Гибко; стандартное обозначение: 041-0190011), дополненной 3 г/мл глюкозы и 4 ммоль глутамин. Инкубируют в течение 2 часов при 37°C. Культуральную среду удаляют и добавляют 2 мл такой же среды с добавкой 200 микроюри метионина с ^{35}S (стандартное обозначение: SJ 1015, Америксхам). Инкубируют в течение 6 часов при 37°C. Культуральную среду извлекают, центрифугируют ее в течение 5 минут для удаления остатков клеток и суспендированных клеток, и супернатант сохраняют.

3) Анализ радиомаркированных протеннов трансфектированных клеток COS путем электрофореза на поликриламидном геле:

Осаждают 1 мл супернатанта трансфектированных клеток COS 9 мл ацетона при -20°C. Центрифугируют и рекуперировывают осадки протеннов. Их обрабатывают в буфере состава: 0,125 М Трис-HCl, pH=6,8; 4% додецилсульфата натрия, 20% глицерина; и нагревают при 100°C в течение 10 минут. Аликвотную часть полученной суспензии, соответствующую радиоактивности 200 000 импульсов в минуту, анализируют путем электрофореза на 15%-ном

полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, согласно методу, описанному U.K. Zaemmti, Anal., Biochem., 1977, 78, 459. Гель высушивают в вакууме. Радиомаркированные протеины обнаруживают с помощью ауторентгенографии. На ауторентгенограмме устанавливают наличие двух лишних полос для клеток, трансфектированных с помощью плазмидной ДНК клона NC30, по сравнению с контрольными клетками: отчетливая полоса высокой интенсивности, соответствующая молекулярной массе около $9,0 \pm \text{kDa}$, и диффузная полоса слабой интенсивности, соответствующая кажущейся молекулярной массе $16,0 \pm 2$ килодальтонов. Следовательно, клон NC30 кодирует секретированный протеин, называемый в дальнейшем протеином NC30. Молекулярная масса для формы протеина согласно изобретению, соответствующая около 9 ± 2 kDa, меньше молекулярной массы, рассчитанной для зрелого протеина из 112 аминокислот и равной 12366 Da. Это различие вероятно вызвано электрофоретической мобильностью, неожиданной для этой формы протеина согласно изобретению.

Полоса молекулярной массы около $16,0 \pm 2$ kDa может соответствовать N-гликозилированной форме протеина согласно изобретению. В самом деле, она имеет четыре возможных сайта N-гликозилирования, подчеркнутых пунктирной линией на фиг. 2 и соответствующих обобщающей типичной последовательности, описанной Donner и др., 1987, J. Cell. Biol., 105, 2665.

4) Выявление возможного N-гликозилирования протеина с молекулярной массой около 16 ± 2 kDa

Маркировку протеинов осуществляют как описано выше в 2), но в присутствии 10 мкг/мл туникамицина (Сигма; стандартное обозначение: T 7765), агента, ингибирующего N-гликозилирование протеинов.

Анализ протеинов на полиакриламидном геле осуществляют как описано в 3).

На ауторентгенограмме устанавливают наличие одной лишней полосы 9 ± 2 килодальтонов для клеток, трансфектированных плазмидной ДНК клона NC30, по сравнению с контрольными клетками. Эти результаты показывают, что форма рекомбинантного протеина, рассматриваемого в п. 3), которая соответствует молекулярной массе 16 ± 2 kDa, является N-гликозилированной.

РАЗДЕЛ 7:

Продукция протеина NC30 в клетках COS

$4,3 \times 10^7$ Клеток COS высевают в цилиндрическую качалочную колбу, называемый обычно "роллер", с поверхностью 850 см², в 150 мл среды DMEM, которая содержит 0,6 г/л глутамина, 3,7 г/л гидрокарбоната натрия и дополнена плодной телячьей сывороткой (Гибко) в количестве 5%, затем буферизуют диоксидом углерода.

Спустя примерно 16 часов культивирования при 37°C на качалке (скорость вращения около 0,2 оборотов в минуту), культуральную среду удаляют путем отсасывания и клетки промывают буфером 3ФР

(забуференный фосфатом физиологический раствор). К ним затем добавляют смесь следующего состава: 35 мл среды DMEM + 10% плодной телячьей сыворотки (Сигма), 4 мл диэтиламиноэтилдекстрана (Фармация, средняя молекулярная масса 500 000) в концентрации 2 мг/мл, 40 мкл, 100 мМ Хлороксина (Сигма) и 128 мкг плазмидной ДНК клона NC30, полученной по методу щелочного лизиса с последующей очисткой плазмидной ДНК на градиенте хлорида цезия (Sambrook и др., цитировано выше).

После инкубации в течение 5 часов при 37°C в атмосфере, содержащей 5% диоксида углерода, смесь удаляют с клеток. После этого к ним добавляют 35 мл буфера 3ФР, содержащего 7% диметилсульфоксида (качества "для спектроскопии", Мерк), при 4°C. После перемешивания путем вращения в течение 1 минуты 30 секунд при комнатной температуре, смесь удаляют и клетки промывают два раза с помощью 3ФР. Добавляют 150 мл среды α MEM (Сигма), содержащей 1% плодной телячьей сыворотки (SVF), на роллер, и клетки инкубируют при 37°C в присутствии 5% диоксида углерода (вращение со скоростью 0,2 оборота в минуту). Спустя один день после трансфекции, среду удаляют путем отсасывания, клетки промывают 2 раза с помощью 3ФР. После этого добавляют 150 мл на роллер среды DMEM (Сигма) без сыворотки и роллеры выдерживают при 37°C в присутствии 5% диоксида углерода (при вращении со скоростью 0,2 оборота в минуту) в течение 5 дней.

Сбор осуществляют на 6-й день после трансфекции. Культуральную среду центрифугируют со скоростью 7000 оборотов в минуту в течение 10 минут; супернатант отфильтровывают через фильтр 0,2 мкм Nalgene.

РАЗДЕЛ 8:

Очистка протеина NC-30, продуцированного в клетках COS, и определение его аминоконцевой последовательности

1) Очистка протеина NC-30

Рекомбинантный протеин с молекулярной массой около 9 ± 2 kDa, из 500 мл полученного в разделе 7 супернатанта, очищают с помощью следующих стадий:

- ионообменная хроматография на колонке Sfast flow (Фармация) (15 x 100 мм), предварительно уравновешенной с 50 мМ раствором ацетата натрия, pH = 4,0, при использовании в качестве элюирующего средства 1М раствора NaCl в 50 мМ раствора ацетата натрия в качестве буфера, pH=4,0, с расходом 2 мл/мин;

- элюат концентрируют на мембране Centriprep 10 (Амикон) вплоть до объема около 1 мл, затем подвергают хроматографии ВЭЖХ (с обратной фазой, на колонке C4 (Bownlee) (100 x 2,1 мм), предварительно уравновешенной с раствором, содержащим 30% ацетонитрила и 0,1 % ТФК, с линейным градиентом от 30 до 70% ацетонитрила в растворе, содержащем 0,1% ТФК. Фракции, содержащие рекомбинантный протеин (определяют по электрофоретическому анализу на полиакриламидном геле в

присутствии додецилсульфата натрия), объединяют.

2) Определение аминоконцевой последовательности протенна NC30 с кажущейся молекулярной массой 9±2 kDa

Полученный в п. 1) протени подвергают электрофоретическому анализу на 16%-ном акриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Протеины в течение 1 часа при силе тока 0,8 мА/см² в буфере состава: 25 мМ Трис-бората, pH = 9,0 и 10% метанола, переносят на мембрану Имобилон (мил-

Gly	Pro	Val	Pro	Pro	Ser	Thr
1				5		
Glu	Leu					
15						

которая соответствует четвертому сайту расщепления, предусматриваемому программным обеспечением PS (см. раздел 5 - 2).

РАЗДЕЛ 9:

Конструирование вектора экспрессии кДНК NC30 в дрожжах, плазмиды pEMR 673, и трансформация штамма дрожжей с помощью этой плазмиды:

1) Конструирование плазмиды pEMR 673

Плазмиду pEMR 583 (описывается в европейской заявке на патент 435776) подвергают ферментативному расщеплению с помощью ферментов Hind III и Bam HI. Очистке подвергают большой фрагмент (называемый далее фрагментом А), включающий источник репликации и локус STB в 2 микрона, ген LEU 2d, ген резистентности к ампициллину, источник pBR 322, терминатор гена PGK, ген UR A3, искусственный промотор и начало ргрго - области альфа-феромона.

Фрагмент Hind III и Bam HI (называемый ниже как фрагмент В), включающий конец ргрго-области альфа-феромона и кДНК, кодирующую зрелый протени, фланкированный сайтом рестрикции Bam HI у 3'-конца, получают путем амплификации по методу полимеразно-цепевой реакции (ПЦР) из плазмиды pSE1 - NC30. Последовательность этого фрагмента представлена на фиг. 5. Фрагменты А и В лигируют для получения плазмиды pEMR 673.

а) Описание метода полимеразно-цепевой реакции (ПЦР)

Метод полимеразно-цепевой реакции (ПЦР) представляет собой хорошо известный специалисту метод, который позволяет копировать одновременно две нити последовательности предварительно денатурированной ДНК, используя два олигонуклеотида в качестве праймеров (см. особенно работу H.A. Erlich "PCR. Technology Principles and Applications for DNA amplification" опубликованную в 1989 г. издателями Macmillan Publishers Ltd., Royaume-Uni, и

CAGTGAATTC A AGC TTG GAT AAA AGA

Ser	Leu	Asp	Lys	Arg
				Область 1

имеет две различные области: область 1, которая содержит конец ргрго - области альфа-феромона.

липор), затем проявляются с помощью Кумасси-синего.

Полосу с молекулярной массой около 9±2 kDa вырезают и помещают в секвенатор Applied Biosystems модель 470 А, соединенный с анализатором фенилтиогидантоиновых производных Applied Biosystems модель 120 А.

Полученная аминоконцевая последовательность представляет собой следующую последовательность (tr₀),

Ala	Leu	Arg	Glu	Leu	He	Glu
		10				

работу M.A. Innis и др. "PCR Protocols", Опубликованную в 1990 г. Academic Press Inc., Сан-Диего, Калифорния, 92101, США). Принцип этого метода кратко излагается ниже.

Метод ПЦР основан на повторении в три этапа, позволяющем получить, после 10 - 30 циклов, сотни тысяч копий первоначальной матрицы, с помощью ДНК-полимеразы *Thermus aquaticus*, обычно называемой Taq - полимеразой. Эти три этапа представляют собой следующие:

- Денатурация матрицы

Двунитевую ДНК денатурируют до одонитевой ДНК путем инкубирования при высокой температуре (92-96°C) в течение примерно двух минут.

- Гибридизация праймеров

Эти праймеры представляют собой пару синтетических олигонуклеотидов, которые гибридизируются с концами амплифицируемой области. Два праймера гибридизируются с противоположными нитями. Праймеры добавляют в избытке, так, чтобы благоприятствовать образованию комплекса праймер-матрица.

- Удлинение (инсерция) праймеров

Этап, в процессе которого Taq, - полимеразы обеспечивает удлинение комплекса праймер-матрица от 5'-конца к 3'-концу, осуществляют при 72°C.

В методе ПЦР, целевой продукт появляется в третьем цикле и тогда он в значительной степени амплифицирован. В процессе раскрытия циклов, продукт амплификации быстро становится матрицей, с которой гибридизируются праймеры.

б) Описание используемых праймеров

Получают два синтетических олигонуклеотида. Первый олигонуклеотид, называемый праймером 1, последовательность которого следующая:

TCC CCA GGC CCT GTG CCT CC

Ser	Pro	Gly	Pro	Val	Pro
					Область 2

модифицированной по сравнению с природной последовательностью, описанной Kijjan и др., 1982,

Cell, 30, 933-943, путем молчащей мутации, которая позволяет вводить сайт расщепления Hind III точно перед кодирующей частью области 1 (одиннадцатый нуклеотид области 1); и область 2, которая является областью, предназначенной для гибридизации с кодирующей областью, соответствующей началу зрелого протеина из 114 аминокислот (см. раздел 5), некодирующей нити кДНК NC30.

Второй олигонуклеотид, называемый праймером -2, последовательность которого является следующей:

CGACGGATCC CAAATAATGA TGCTTTCGAA G
область 1 область 2

также состоит из двух различных областей: область 1, которая в четвертом нуклеотиде содержит сайт BamHI, и область 2, которая включает нуклеотидную последовательность, соответствующую неперезавершенной 3'-области кДНК NC30. Эта область предназначена для гибридизации с кодирующей нитью кДНК NC30.

в) Получение амплифицированного фрагмента Hind III - Bam HI, представляющего собой конец α -феромона и кДНК, кодирующую зрелый белок NC30

В качестве матрицы используют плазмиду pSEI - NC30, которая включает кДНК, кодирующую протеин NC30.

В пробирку вносят 100 нг плазмиды pSEI - NC30, 100 нг праймера 1, 100 нг праймера 2, 5 мкл концентрированной в 10 раз реакционной смеси (конечная концентрация: 67 ммоль Трис-HCl, pH=8,8; 1,6 ммоль сульфата аммония; 1 ммоль А-меркаптоэтанол; 6,7 ммоль ЭДТК; 0,15% Тритон X 100; 2 ммоль хлорида магния; 0,2 ммоль dNTP; 200 нг желатин); объем смеси затем доводят до 50 мкл путем добавления воды.

Добавляют 0,5 мкл, или 2,5 единицы, полимера-
зы Taq (Boehringer Mannheim, стандартное обозначение: 1146-173). После этого смесь покрывают пара-
фином, чтобы избежать испарения водного раствора.

Амплификацию проводят в течение 15 реакционных циклов, со следующими стадиями одного цикла:

- 1 минута при 94°C - денатурация
- 1 минута при 55°C - гибридизация
- 1 минута при 72°C - полимеризация.

После 15 циклов ферментативную реакцию прекращают путем добавления 20 ммоль ЭДТК.

Таким образом амплифицированный фрагмент ДНК, который имеет ожидаемую величину примерно из 380 пар оснований, затем очищают на 1%-ном агарозном геле, подвергают диализу с хроматографированием на колонке из полиакриламидного геля Р 10 (Фармация), затем полностью и одновременно гидролизуют с помощью ферментов Hind III и Bam III, согласно обычным, хорошо известным специалисту способам (Sombreck, 1983), чтобы получить когезивные концы Hind III и Bam III. После гидролиза фрагмент очищают на колонке Р 10.

Последовательность полученного фрагмента В представлена на рисунке 5. Она включает в своей, кодирующей протенин NC30, части молчащую по отношению к кДНК NC30 мутацию, указанную с помощью звездочки на рисунке 5. Фрагменты А и В лигируют с целью получения плазмиды pEMR 673.

2) Трансформация штамма дрожжей EMU 761 с помощью плазмиды rEMR 673 и экспрессия протеина NC30 трансформированным штаммом

Штамм ЕМУ α -Mat, Leu 2, ura 3, his 2), описанный в европейском патенте 0408461 и который может быть получен путем удаления плазмиды из штамма, депонированного в Национальной коллекции культур микроорганизмов 27 декабря 1989 г. под номером 1 - 1021, содержит мутации (leu 2 и ura 3), которые могут быть комплементированы маркером дефективной (неполной) селекции LEU2d и маркером селекции UR A3, присутствующими в плазмиде pEMR 673. Штамм трансформируют с помощью плазмиды pEMS 673 при селекции для прототрофии лейцина согласно варианту способа трансформации, описанного Beggs и др. (Beggs и др., 1978, Nature, 275, 104-109), который заключается в том, что дрожжи подвергают протопластизирующей обработке в присутствии осмотического стабилизатора, сорбитола, в концентрации 1 моль.

Краткое изложение протокола трансформации приводится ниже:

- а) 200 мл жидкой среды YPG (см. таблицу 1 ниже) инокулируют с помощью примерно 5×10^6 клеток культуры в стационарной фазе и таким образом инокулированную культуру оставляют на ночь при перемешивании при 30°C ;
- б) когда культура достигает примерно 10^7 клеток на мл, то клетки центрифугируют в течение 5 минут со скоростью 4000 оборотов в минуту и осадок после центрифугирования промывают 1М раствором сорбитола;
- с) клетки суспендируют в 5 мл 1М раствора сорбитола, содержащего 25 ммоль ЭДТК и 50 ммоль дитиотрептола, и инкубируют в течение 10 минут при 30°C ;
- д) клетки промывают один раз с помощью 10 мл 1М раствора сорбитола и суспендируют в 20 мл раствора сорбитола. Добавляют зимолазу-100Т (препарат, выпускаемый в продажу фирмой Seiyokagaku Kogyo co. Ltd., который получают путем частичной очистки на аффинной колонке супернатанта культуры *Athrobacter luteus* и который содержит β -1,3-глюканаза-ламинарипентагидролазу) в конечной концентрации 20 мкл/мл и суспензию инкубируют при комнатной температуре в течение примерно 15 минут;
- е) клетки снова суспендируют в 20 мл среды, содержащей сорбитол и называемой YPG-сорбитол (см. таблицу 1 ниже), и инкубируют в течение 20 минут при 30°C и при умеренной перемешивании;
- ф) центрифугируют в течение 3 минут со скоростью 2500 оборотов в минуту;

г) клетки снова суспендируют в 9 мл буфера для трансформации следующего состава: 1 М сорбитола, 10 мМ Трис-HCl, pH=7,5; и 10 мМ хлорида кальция;

h) берут 0,1 мл клеток и 5 мкл раствора ДНК (около 5 мкг) и полученную суспензию оставляют стоять в течение 10-15 минут при комнатной температуре;

i) добавляют 1 мл раствора следующего состава: 20% ПЭГ (полиэтиленгликоля) 4000, 10 мМ Трис-HCl, pH=7,5; и 10 мМ хлорида кальция;

j) 0,1 мл полученной в п. i) суспензии вносят в пробирку, содержащую твердую регенерационную среду без лейцина (см. таблицу 1 ниже), предварительно расплавленную и поддерживаемую в жидком состоянии примерно при 45°C. Суспензию выливают в чашку Петри, содержащую затвердевший слой из 15 мл твердой регенерационной среды без лейцина.

Трансформанты начинают появляться по истечении трех дней. Таким образом получают трансформант, называемый штамм EMY761 pEMR 673.

Таблица 1

Состав и приготовление основных сред, используемых в протоколе трансформации штамма дрожжей EMY 761

- жидкая среда YPG:

10 г дрожжевого экстракта (Bacto- Yeast-экстракт, Дифко)

20 г пептона (бакто-пептон, Дифко)

20 г глюкозы;

смешать ингредиенты в дистиллированной воде; дополнить до конечного объема 1 л с помощью дистиллированной воды; автоклавировать в течение 15 минут при 120°C.

- среда YPGсорбитол:

использовать состав жидкой среды YPG: к которой, после автоклавирования, добавляют сорбитол в концентрации 1 моль.

-твердая регенерационная среда без лейцина:

6,7 г азотистого основания дрожжей без аминокислот (Дифко);

20 мг аденина

20 мг урацила

20 мг L-триптофана

20 мг L-гистидина

20 мг L-аргинина

20 мг L-метионина

30 мг L-тирозина

30 мг L-изолейцина

30 мг L-лизина

50 мг L-фенилаланина

100 мг L-глутаминовой кислоты

150 мг L-валина

20 г глюкозы

30 г агара

182 г сорбитола;

смешать все ингредиенты в дистиллированной воде; дополнить объем до 1 л с помощью дистиллированной воды; автоклавировать в течение 15 минут

при 120°C; после автоклавирования добавить 200 мг L-треонина и 100 мг L-аспарагиновой кислоты.

РАЗДЕЛ 10:

Экспрессия в эрленмейере протеина NC30 трансформированным штаммом дрожжей и обнаружение протеина в культуральной среде на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия

1) Культивирование штамма EMY761 pEMR 673

Колонию штамма EMY761 pEMR 673 (получен в Разделе 9) культивируют в 50 мл жидкой среды без урацила. Эта среда содержит на литр:

6,7 г азотистого основания дрожжей без аминокислот (Дифко)

- 5,0 г казеинового гидролизата (казаминокислоты, Дифко)

- 10 г глюкозы.

После перемешивания в течение ночи при 30°C, культуру центрифугируют в течение 10 минут, осадок после центрифугирования обрабатывают с помощью 10 мл стерильной воды и снова центрифугируют в течение 10 минут. Экспрессию протеина NC30 индуцируют, активизируя клетки в 50 мл среды следующего состава:

- 6,7 г/л азотистого основания дрожжей без аминокислот (Дифко)

- 5,0 г/л казеинового гидролизата (казаминокислоты, Дифко)

- 30,0 г/л глицерина

- 30,0 г/л галактозы

- 10 мл/л этанола.

Культивируют в течение 24 часов при перемешивании и при 30°C.

2) Анализ экспрессированного протеина:

а) полиакриламидный гель в присутствии додецилсульфата натрия Подготовка образцов:

Часть клеток, культивированных в течение 1 ночи в среде, называемой жидкой средой без урацила, с глюкозой, состав которой конкретно приводится ниже в таблице 2, центрифугируют: неиндуцированный образец. Клетки, культивированные в течение 1 ночи в среде, называемой жидкой средой без урацила, с этанолом, глицерином и галактозой (таблица 2 ниже), центрифугируют: индуцированный образец. Супернатант собирают. К 10 мл супернатанта добавляют 5 мл 50%-ной трихлорууксусной кислоты, содержащей 2 мг/мл дезоксихолята.

Смесь выдерживают в течение 30 минут при температуре +4°C, затем центрифугируют в течение 30 минут. Осадок после центрифугирования обрабатывают примерно 1 мл охлажденного ацетона (+4°C) и снова центрифугируют в течение 30 минут. Осадок, после высушивания, обрабатывают примерно 20 мкл буфера, называемого заполняющим буфером (tampon de charge), который состоит из 0,125 М Трис-HCl, pH=6,8; 4% додецилсульфата натрия, 0,002% бромфенолового синего, 20% глицерина, 10% β-меркаптоэтанола, согласно протоколу, описанному

Лэмбли в 1970 г. что хорошо известно специалисту. Осадок растворяют путем кипячения в течение 15 минут, затем нейтрализуют.

Образцы помещают на акриламидный гель в присутствии додецилсульфата натрия и подвергают электрофорезу.

Результаты:

Анализ геля (обнаружение по Кумасси-синему) для индуцированного образца показывает присутствие нескольких дополнительных полос (зон) по сравнению с неиндуцированным образцом, из которых два основных соответствуют молекулярной массе 9 ± 2 и 16 ± 2 kDa. Другие наблюдаемые дополнительные полосы, которые довольно многочисленны и диффузны, вероятно соответствуют изменяемой степени гликозилирования.

Известно, что N-гликозилирование протенна дрожжами включает простое N-гликозилирование ("сердцевинное гликозилирование") в эндоплазматической сети и N-гипергликозилирование ("внепочечное гликозилирование") в аппарате Гольджи R.A. Hitzeman и др., 1990, "Methods in Enzymology № 185, Academic Press с. 421-440). Вообще, простое N-гликозилирование приводит к гликопротенну с однородной кажущейся массой (одна полоса), а N-гипергликозилирование приводит к гликопротенну с неоднородной кажущейся молекулярной массой (множество диффузных полос).

б) Иммуноимпринтинг (вестерн-блотирование) с возможной обработкой эндогликозидазой Н

Приготовление образцов

Часть клеток, культивированных в течение ночи в жидкой среде без уратида, с глюкозой (таблица 2), центрифугируют: неиндуцированный образец. Клетки, культивированные в течение ночи в жидкой среде без уратида, с этанолом, глицерином и галактозой (таблица 2), центрифугируют: индуцированный образец. Супернатант собирают. К 10 мл супернатанта добавляют 5 мл 50%-ной трихлоруксусной кислоты, содержащей 2 мг/мл дезоксихолята.

Смесь выдерживают при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 30 минут, затем центрифугируют в течение 30 минут. Осадок после центрифугирования обрабатывают примерно 1 мл охлажденного ацетона ($+4^{\circ}\text{C}$) и снова центрифугируют в течение 30 минут. Осадок после центрифугирования обрабатывают 20 мкл растворяющего буфера (состава: Трис-HCl с pH=6,8, 10 ммоль; 2% β -меркаптоэтанола; 1% додецилсульфата натрия). Осадок выдерживают при 100°C в течение 5 минут.

Образец затем делят на две части:

- к первой части, равной 10 мкл, добавляют 10 мкл 50 mM натрийцитратного буфера с pH= 5,5, содержащего эндогликозидазу Н (5мU1 : Beehringer стандартное обозначение: 1088726). Образец выдерживают при 37°C в течение примерно ночи. Затем добавляют 20 мкл заполняющего буфера;

- ко второй части, равной 10 мкл, добавляют 10 мкл заполняющего буфера. Образцы кипятят в течение 10 минут. Образцы помещают на полиакрила-

мидный гель в присутствии додецилсульфата натрия и осуществляют электрофорез согласно протоколу Лэмбли (ссылка приведена выше). Содержащиеся в геле протенны затем переносят на нитроцеллюлозную мембрану (согласно способу H. Towbin и др., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci., США, 76, 4350-4354). Иммунодетектирование, осуществляемое согласно протоколу, описанному в наборе для анализа путем иммуно-блотирования фирмы Био-Рад (стандартное обозначение: 170-6450), включает следующие стадии:

- насыщение нитроцеллюлозной мембраны буфером ЗТР ("трис-забуференный физиологический раствор"), который содержит 3 г/100 мл желатины, в течение 30 минут;

- промывка мембраны с помощью буфера, называемого ЗТТР (буфер ЗТР, который содержит 0,05% Твина 20), два раза в течение 5 минут;

- введение в контакт мембраны с иммуносывороткой, приготовленной в разделе 13, в течение 1 часа при комнатной температуре;

- промывка мембраны с помощью буфера ЗТТР, два раза в течение 5 минут;

- введение в контакт мембраны с конъюгируемым антителом из набора;

- промывка мембраны с помощью буфера ЗТТР два раза в течение 5 минут и один раз в течение 5 минут с помощью буфера ЗТР;

- комплекс антиген-антитело обнаруживают путем введения в контакт мембраны с проявляющим буфером, содержащим 5-бром-4-хлор-3-индолил-фосфат (BCIP) и нигротетразолиевый синий (NBT);

- промывка мембраны водой.

Результаты:

Анализ путем вестерн-блотирования для индуцированного, необработанного эндогликозидазой Н, образца показывает наличие нескольких дополнительных полос (зон) по сравнению с неиндуцированным образцом две основные полосы которого соответствуют молекулярной массе около 9 ± 2 и 16 ± 2 kDa. Также обнаруживают другие многочисленные и диффузные полосы с более высокой молекулярной массой. Все эти полосы распознают с помощью иммуносыворотки, приготовленной в разделе 13.

В индуцированном образце полоса, соответствующая молекулярной массе около 16 ± 2 kDa имеет тенденцию к исчезновению после обработки эндогликозидазой Н, тогда как полоса с массой 9 ± 2 килодальтонов увеличивается по интенсивности в тех же условиях. Эти результаты показывают, что протенн с молекулярной массой около 16 ± 2 к а является N-гликозилированным.

Диффузные полосы с более высокой молекулярной массой также исчезают и замечают появление двух полос, соответствующих молекулярным массам около 18 ± 2 и 20 ± 2 kDa. Формы протенна NC30, устойчивые к обработке эндогликозидазой Н, могут соответствовать предшественнику, сохраняющему про-последовательность феромона, или 0-гликозилированным формам протенна NC30.

Таблица 2

Состав и приготовление некоторых сред, используемых для получения образцов

- жидкая среда без уранила, с глюкозой
- 6,7 г азотистого основания дрожжей без аминокислот (Дифко)
- 5,0 г казеинового гидролизата (казеиннокислоты, Дифко)
- 10,0 г глюкозы;

смешать все ингредиенты в дистиллированной воде и дополнить среду до конечного объема 1 л с помощью дистиллированной воды; автоклавировать в течение 10 минут при 120°C;

- жидкая среда без уранила, с этанолом, глицерином и галактозой:

использовать состав жидкой среды без уранила, описанный выше, но без глюкозы. После автоклавирования добавить 10 мл 100%-ного этанола, 30 г глицерина и 30 г галактозы.

РАЗДЕЛ II:

Продуцирование протеина NC30 в ферментере с помощью штамма EMU761 pEMR 673

Культивирование штамма EMU761 pEMR 673 осуществляют в ферментере следующим образом:

а) Фаза предкультивирования в конической колбе с перегородками

Исходя из 1 мл культуральной суспензии, содержащей 20% глицерина, вышеуказанного штамма с числом клеток, соответствующим оптической плотности 3 для $\lambda = 600$ нм (на спектрографе Контрон), засевают коническую колбу с перегородками емкостью 500 мл, содержащую 90 мл полусинтетической среды для выращивания автоклавируемой фазы (МСНРА), дополненные 1,28 г буфера МЭС - на основе 2-(N-морфолино) этансульфонокислоты- (М 8250, Сигма), и 10 мл полусинтетической среды для выращивания отфильтровываемой фазы (МСНРФ). Химические составы и способ приготовления сред МСНРА и МСНРФ приводятся конкретно ниже. По-

сле инкубации с течением 24 часов при перемешивании при 30°C оптическая плотность культуры при $\lambda = 600$ нм составляет около 7.

б) Фаза роста в ферментере

Вышеуказанную культуру используют для засева ферментера емкостью 2,5 л, предварительно заполненного 800 мл среды МСНРА и 100 мл среды МСНРФ.

pH-Значение культуры в ферментере устанавливают 5.5. Точно также давление кислорода поддерживают выше 4 000 Па (30 мм. рт.ст.) путем регулирования перемешивания. Первоначально расход воздуха устанавливают равным 1 л/мин., или около 1 объема на один объем в минуту, затем, в зависимости от потребностей, ступенчато увеличивают.

После культивирования в течение 6-7 часов при 30°C, добавляют, равномерно и в течение 9 часов, 72 мл раствора глюкозы с концентрацией 500 г/л, или в целом 36 г глюкозы.

в) Фаза экспрессии в ферментере

К вышеописанной смеси добавляют 100 мл полусинтетической среды для экспрессии автоклавируемой фазы (МЕНРА) и 100 мл полусинтетической среды для экспрессии отфильтровываемой фазы (МЕНРФ), химические составы и способ приготовления которых указываются конкретно ниже. Культивирование затем продолжают в течение примерно 5 часов без всякой добавки. За концентрациями трех источников углерода (глицерин, галактоза, этанол) следят с помощью ВЭЖХ и дополняют путем стерильных инъекций, чтобы соблюдать следующие значения:

15 г/л глицерина, 15 г/л этанола, 7,5 г/л галактозы.

Спустя 23-24 часа и при индукции, достигают оптической плотности при $\lambda = 600$ нм, близкой к 90, и культивирование прекращают.

Культуральную суспензию затем центрифугируют с ускорением 11 500 g в течение 30 минут. Осадок клеток дрожжей удаляют, сохраняемый супернатант замораживают при -80°C.

Химический состав сред для выращивания и экспрессии

- Полусинтетическая среда для выращивания автоклавируемой фазы "МСНРА"

	В расчёте на конечный объём 800 мл (со сверхчистой водой)
ИТК (нитрилуксусная кислота)	1г
K ₂ SO ₄	1г
хлорид натрия	0.5 г
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.0
CaCl ₂ · 7H ₂ O	700 мг
глутаминовая кислота	3.7 г
HY-CASE SF(Sheffield Product)	25 г
лейцин	1.8 г

гистидин	500 мг
метионин	1 г
микроэлементы типа 1-5 (см. ниже)	5 мл

Довести до pH = 5,5 с помощью концентрированной серной кислоты или концентрированного раствора гидроксида калия.

Автоклавировать в течение 20 минут при 120°C.

-Перечень микроэлементов типа 1-5

		В расчете на конечный объем 1 литр (со сверхчистой водой)
сульфат меди	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	780 мг
борная кислота	H_3BO_3	5 г
сульфат цинка	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3 г
иодид калия	KI	1 г
сульфат марганца	$\text{MnSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,5 г
молибдат натрия	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2 г
хлорид железа	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	4,8 г

Добавить к раствору 100 мл концентрированной соляной кислоты. Долить до 1 000 мл.

- Полусинтетическая среда для выращивания отфильтровываемой фазы "МСНPF"

		В расчете на конечный объем 100 мл (со сверхчистой водой)
KH_2PO_4		4 г
триптофан		350 мг
витамины типа 1-S (см. ниже)		1 мл
глюкоза		15 г

Нагревать для растворения, разбавлять, добавлять витамины типа 1 - S и стерилизовать путем фильтрации через мембрану 0,2 мкм.

- Перечень витаминов типа 1 - S

		В расчете на конечный объем 100 мл (со сверхчистой водой)
биотин		5 мг
фолиевая кислота		4 мг
ниацин		6 мг
(пиридоксин-никотиновая кислота НС1)		250 мг
тиамин. НС1		1 г
пантотенат кальция		5 г
м-инозитол		10 г

После растворения дополнить до объема 100 мл. Стерильно фильтровать на холоду через мембрану 0,2 мкм. Хранить при температуре +4°C.

- Полусинтетическая среда для экспрессии автоклавируемой фазы "МЕПРА"

		В расчете на 400 мл (со сверхчистой водой)
НТК		1 г
K_2SO_4		1,74 г
глутаминовая кислота		1,8 г
HY-CASE SF (Sheffield Products)		500 мг
лейцин		1 г
гистидин метионин триптофан'		350 мг

MgSO₃·2H₂O

600 мг

микроэлементы типа I - S (см. выше)

5 мл

Довести pH до 5,5 с помощью концентрированной серной кислоты или концентрированного

раствора гидроксида калия. Автоклавировать в течение 20 минут при температуре 120°C.

-Полусинтетическая среда для экспрессии отфильтровываемой фазы "МЕНПФ"

	В расчете на конечный объем 100 мл (со сверхчистой водой)
KH ₂ PO ₄	2 г
триптофан	350 мг
витамины типа I-S (см. выше)	1 мл
глицерин	15 г
этанол	15 г
галактоза	7,5 г

Нагревать для растворения, разбавлять, добавлять витамины и стерилизовать путем фильтрации через мембрану 0,2 мкм.

г) Анализ продуцированного протеина

Образцы готовят способом, аналогичным таковому, описанному в Разделе 10, и подвергают электрофорезу на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Наблюдают распределение полос (зон) на геле, идентичное таковому, наблюдаемому в Разделе 10 для индуцированного образца.

РАЗДЕЛ 12:

Очистка продуцированного в дрожжах протеина NC30 и определение его аминоконцевой последовательности и его пептидной карты

Очистка двух мажоритарных форм протеина NC30

Выделяют две мажоритарные формы рекомбинантного протеина дрожжей, полосы которых соответствуют молекулярным массам, после электрофореза на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия, составляют около 9±2 и 16±2 kDa и очищают, исходя из 500 мл супернатанта, полученного в Разделе 11, согласно следующему методу: Осуществляют последовательно несколько стадий:

- ионообменная хроматография на колонке Q fast flow, (Фармация) (5x5 см), предварительно уравновешенной с 50 мМ раствором ацетата натрия, pH=4,0. Расход: 1 мл/мин. pH-значение супернатанта предварительно доводят до 4,0. В этих условиях работы протеин не фиксируется на геле;

- ионообменная хроматография на колонке Q fast flow (Фармация) (5x4 см), предварительно уравновешенной с 50 мМ раствором ацетата натрия, pH=4,0, при использовании в качестве элюирующего средства 1М раствора хлорида натрия в 50 мМ натрийацетатном буфере, pH=4,0. Расход: 1 мл/мин. - элюат концентрируют на мембране UM5 (Амнион) вплоть до объема около 2 мл, затем вносят в колонку для гель-фильтрации ACA 54 (IBF) (100 x 1,5 см),

уравновешенную в 0,1 М фосфатном буфере, содержащем 0,14 М IаCl; расход: 0,2 мл/мин. Фракции, содержащие рекомбинантный протеин (определяют путем электрофоретического анализа на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия) объединяют.

Таким образом полученный раствор подвергают электрофоретическому анализу на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и проявляют нитратом серебра. Наблюдают две мажоритарные формы протеина NC30, соответствующие молекулярным массам около 9±2 и 16±2 kDa, со степенью чистоты выше 70%. Этот раствор используют в нижеописанных тестах на биологическую активность.

В другом эксперименте, в этот протокол (методику) очистки вводят стадию ВЭЖХ с обратной фазой на колонке C4 (Brownlee.) при использовании в качестве элюирующего средства линейного градиента от 30 до 70% ацетонитрила в 0,1%-ном растворе ТФК (трифторуксусная кислота), что позволяет получать продукт, имеющий степень чистоты выше 90% (оценивают путем электрофоретического анализа на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия и проявляют нитратом серебра).

2) Определение аминоконцевой последовательности двух мажоритарных форм протеина NC30:

Очищенный протеин подвергают электрофорезу на 16%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Протеины геля переносят на мембрану Имобилон (миллпор), при 0,8 мА/см², в течение 1 часа в буфере состава: 25 мМ трис-бората, pH=9,0, и 10% метанола.

Две полосы, соответствующие молекулярным массам около 9±2 kDa, и 16±2 kDa, вырезают и помещают в секвенатор Applied Biosystems модель 470 А, соединенный с анализатором фенилтиогидантоновых производных Applied Biosystems модель 120 А.

Эти две полосы имеют одну и ту же аминоконцевую последовательность (tr₁):

Ser	Pro	Gly	Pro	Val	Pro	Pro	Ser	Thr	Ala	Leu
1				5					10	

которая является ожидаемой аминоконцевой последовательностью: последовательность зрелого протеина из 114 аминокислот (см. фиг. 2), описанная в Разделе 5, кодирующую последовательность которого вводят в вектор pEMR 673, описанный в Разделе 9.

3) Определение пептидной карты формы протеина NC30 с молекулярной массой около 9±2 kDa

Протеин с молекулярной массой около 9±2 kDa расщепляют в геле с помощью свиного трипсина и пептиды разделяют с помощью ВЭЖХ с обратимой фазой в следующих условиях:

Полученный в Разделе 11 супернатант дрожжей осаждают с помощью трихлоруксусной кислоты и преципитат, после растворения при 100°C в буфере, содержащем додецилсульфат натрия, подвергают электрофорезу на полиакриламидном геле. Протеины геля проявляют с помощью Кумасси-синего. Из геля вырезают полосу с молекулярной массой около 9±2 kDa и гидролизуют с помощью свиного трипсина в геле согласно методу, описанному в статье J. Rosenfeld и др., находится в процессе публикации "In gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one or two dimensional gel electrophoresis".

Затем трипсиновые пептиды разделяют путем ВЭЖХ обратной фазой на колонке Altex C 18 (0,21 x 25 см) Бекмана с градиентом от 1 до 70% ацетонитрила в 0,1%-ном растворе ТФК в течение 60 минут. Пики определяют путем измерения оптической плотности при 218 нм.

Две фракции, соответствующие, каждая, одному пику, называемые ниже первая фракция и вторая фракция, анализируют с помощью секвенатора модель 470 А, как указано выше.

Полученные аминокислотные последовательности представляют собой следующие:

- для первой фракции: Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser Ser Leu His Val, которая соответствует аминокислотам 108 - 118 преобразованного (traduite) протеина RC30 (см. рисунок 2);

- для второй фракции: Ser Pro Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu и LyS Leu Phe, которые соответствуют, соответственно, аминокислотам 33-43 и 138-140 преобразованного протеина NC30 (см. рисунок 2).

РАЗДЕЛ 13:

Цитоплазматическая экспрессия протеина A/C 30 в E.coli и приготовление иммуносыворотки

1) Цитоплазматическая экспрессия протеина NC30 в E.coli:

Экспрессирующий вектор зрелого протеина NC30 из 112 аминокислот, метилированного в E.coli, называемый pSE714.12, конструируют путем вставки в открытый в сайтах NdeI и BamHI вектор pET3a фрагмента ДНК, содержащего часть кДНК

NC30. Этот экспрессирующий вектор включает от 5'-конца к 3'-концу:

- промотор РНК-полимеразы фага Т7, содержащийся в плазмиде pET3a, описанной Rosenberg и др., Gene, 56, 125-135;

- часть кДНК NC30, которая кодирует зрелый протеин из 112 аминокислот (см. Раздел 5), предшествующий ATG-инициатору трансляции;

- терминатор гена 10 фага Т7 (Studier и др., 1986, J. Mol. Biol, 189, 113-130).

Эта кассета экспрессии функционирует только в присутствии специфической РНК-полимеразы фага Т7. Следовательно, нужно синтезировать эту РНК-полимеразу в штамме - хозяине E.coli. Кассету экспрессии этой РНК-полимеразы конструируют, ставя кодирующую этот фермент последовательность (клонированную в ДНК лямбда-фага SE6, согласно Studier и др., 1986, Y.Mol. Biol, 189, 113-130) в зависимости от промотора PR лямбда-фага. Эта кассета экспрессии также включает аллель C1 (C1857), кодирующий термочувствительную форму репрессора этого промотора PR, (P. Lepatois и др., 1983, Biochimie. 65, 317-324). Следовательно, при низкой температуре, кассета экспрессии ДНК-полимеразы подавляется, при высокой температуре экспрессия не подавляется. Эту кассету экспрессии клонируют в векторе интеграции pEJL407, происходящем от плазмиды N. Kjeckner (1984, Gene, 32, 369-379). Полученный вектор представляет собой плазмиду pEMR 648. Этот вектор поддерживается в эпизомическом состоянии в клетке, но он вызывает интеграцию одной или нескольких копий кассеты экспрессии полимеразы (включая туда репрессор C1), когда индуцируют транспозицию с помощью IPTG (изопропил-β-тио-галактозид). Транспозаза, ответственная за эту интеграцию, находится под контролем гена lac I, но сама она не преобразуется, что позволяет получать стабильные интегранты после удаления плазмиды. Трансформируя штамм E.coli K12HB101 (Гибко BRL, стандартное обозначение: 8260 SA) с помощью pEMR. 648, затем вызывая процессы (события) интеграции на трансформантах, получают производное HB101, называемое VG112, которое включает 2 кассеты экспрессии полимеразы фага Т7 под контролем термочувствительной системы PL-CI, интегрированные в хромосому. Штамм VG-112 E.coli очищают от плазмиды pEMR 64 8 и трансформируют, при низкой температуре (30°C), с помощью плазмиды pEMR 714.

Полученный трансформант, называемый штаммом VG-112 pSE714.12, и депонированный в Национальной коллекции микроорганизмов 20 декабря 1991 г. под номером 1-1162, культивируют в среде LB, содержащей ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, при 30°C вплоть до оптической плотности при 600 нм, равной 1. Затем экспрессию гена полимеразы индуцируют с помощью IPTG при 41°C в

течение 2 часов. Анализ всего клеточного экстракта на денатурирующем полиакриламидном геле позволяет выявить белок в 9 килodalтонов, соответствующий лишней полосе, по сравнению с выделенным и не трансформированным штаммом VG112 (контрольный штамм). Лизис клеток путем обработки ультразвуком с последующим центрифугированием позволяет разделить клеточный экстракт на 2 фракции: растворимую фракцию (супернатант) и нерастворимую фракцию (осадок). Белок NC30 находится с белками нерастворимой фракции и составляет около 90% масс, белков этой фракции.

2) Приготовление иммуносыворотки, распознающей белок NC30

Эту нерастворимую фракцию используют для иммунизации кролика (самец весом около 2 кг, Новая Зеландия). Иммунизацию осуществляют все 15 дней согласно протоколу, описанному Vaitukaitis, 1981, *Methods in Enzymology*, 73, 46. Для первой инъекции, один объем раствора антигена эмульгируют в одном объеме полного адъюванта Freund (Сигма; стандартное обозначение: 4258). Шесть повторений осуществляют путем введения неполного адъюванта Freund (Сигма, стандартное обозначение: 5506).

Полученная иммуносыворотка способна распознавать белок NC30, продуцируемый дрожжами и клетками COS путем иммунодетектирования после электрофореза на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия.

а) Характеризация белка NC30 с помощью пептидной карты

Полученную в п. 1) нерастворимую фракцию подвергают электрофорезу на полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Белки геля обнаруживают путем окрашивания Кумасси-синим. Полосы, соответствующую кажущейся молекулярной массе 9 ± 2 килodalтон, вырезают из геля и гидролизуют с помощью свиного трипсина в геле и трипсиновые пептиды разделяют как описано в Разделе 12-3).

Соответствующую пикет фракцию анализируют с помощью секвенатора Applied Biosystems, модель 470A.

Полученная аминоконцевая последовательность является следующей:

Val Ser Ala Gly Cln Phe Ser Ser Leu N Val Arg,

в которых N обозначает не определенную аминокислоту.

Эта последовательность соответствует аминокислотам 108-119 преобразованного белка NC30 (см. фиг. 2) и пептиду первой фракции, проанализированному в Разделе 12.

РАЗДЕЛ 14:

Выявление для белка NC30 ингибирующей активности в отношении продуцирования информационных РНК IL-1 β и IL-6 моноцитами периферической крови, стимулированными ЛПС

ферической крови, стимулированными ЛПС

1) Используемый метод

а) Подготовка клеток

Из аликвоты (unc Roche) периферической крови (предварительно отобранной у здоровых доноров в центре переливания крови) удаляют большую часть эритроцитов путем седиментации при 37°C в течение 30 мин в среде, содержащей 0,6% декстрана и 0,09% хлорида натрия. Затем клетки помещают поверх слоя Ficoll-Paque (Фармация) и центрифугируют при 400 g в течение 30 минут. Мононуклеарные клетки периферической крови (RBMNC), которые находятся на поверхности раздела между Ficoll и супернатантом, отбирают. RBMNC помещают в среду RPMI (среда RPMI 1640, Гибко BRL), содержащую 10% плодной телячьей сыворотки (SVF), находящуюся в чашках для культивирования диаметром 15 см, по $1-5 \times 10^7$ клеток на чашку. Спустя 30 минут среду отсасывают и приросшие к чашке клетки (в основном образованные моноцитами) инкубируют как описано ниже.

б) Инкубация клеток с ЛПС и белком NC30

Приросшие RBMNC инкубируют в 20 мл RPMI / 10% плодной телячьей сыворотки в течение 4 часов при 37°C в атмосфере, содержащей 5% диоксида углерода, в присутствии 5 мкг на мл липополисахарида (ЛПС) (стандартное обозначение: 1.4391, Сигма) и возрастающих концентраций NC30, происходящего от очищенных дрожжей (0,1-10 нг/мл), или супернатантов клеток COS, либо трансфектированных плазмидой pSEI NC30 и культивированных как описано в Разделе 7, либо трансфектированных плазмидой pSEI и культивированных в тех же условиях (контроль).

в) Получение и анализ РНК

Клетки промывают с помощью 3ФР, затем собирают прямо в 1 мл буфера D (следующего состава: 4 М тиоцианата гуанидиния; 25 мМ цитрата натрия; 0,5% саркозила; 0,1 М β -меркаптоэтанол (Chomczynski P. и Sacchi N., (1987), *Anal. Biochem.*, 162, 156-159). РНК получают методом экстракции фенолом при кислом значении pH, описанным этими авторами. Наносят 1-5 мкг РНК на 1%-ный агарозный гель в присутствии формальдегида (Sambrook и др., цитировано выше). После миграции, РНК переносят на усиленную нитроцеллюлозную мембрану (Schleicher и Schuell) и гибридизируют с радиомаркированными кДНК-зондами, как в Разделе 4. Интенсивности гибридизации каждой РНК с различными зондами определяют (количественно) путем фосфоресцентного анализа на приборе Phosphorimager (Molecular Dynamics, 800E, авеню Argues Sunnyvale, Ca, 94086- США).

2) Результаты

Средние значения и стандартные отклонения результатов, полученных с очищенным белком NC30 в четырех экспериментах, представлены в нижеприводимой таблице 3, в которой количества информационных РНК, определенные путем фосфоресцентного анализа, выражены в виде процента по отношению к количеству информационной РНК,

определенному для образца, происходящего от клеток, обработанных одним ЛПС.

ТАБЛИЦА 3

Количества информационных РНК IL-1 β и IL-6, определенные для различных концентраций протеина NC30

Условие стимуляции клеток	количество информационных РНК	
	IL-1 β	IL-6
ЛПС (липополисахарид)	100	100
ЛПС + протеин NC30 в концентрации 0,1 нг/мл	97 $\pm$ 36	77 $\pm$ 18
ЛПС + протеин NC30 в концентрации 1 нг/мл	54 $\pm$ 39	24 $\pm$ 11
ЛПС + протеин NC30 в концентрации 10 нг/мл	30 $\pm$ 5	13 $\pm$ 4

Из таблицы, приводимой выше, следует, что аккумуляция информационных РНК IL-1 β и IL-6 в моноцитах, обработанных с помощью липополисахарида, инкубируется протеином NC30. Наиболее значительное ингибирование обнаруживают для концентрации 10 нг/мл протеина NC30, и доза для достижения ингибирования на 50% (ИК₅₀) составляет величину порядка 1 нг/мл.

Точно также устанавливают ингибирование продуцирования информационных РНК IL-1 β и IL-6 в присутствии супернатантов клеток COS, трансфектированных плазмидой pSEI-NC30, и не обнаруживают никакого ингибирования в присутствии супернатантов контрольных клеток COS.

Также во время других экспериментов устанавливают ингибирование продуцирования протеинов IL-1 β и IL-6 в культуральных средах моноцитов, обработанных ЛПС, в присутствии протеина NC30. IL-6 анализируют количественно по его воздействию на пролиферацию линии гибридомы B9 по методу, описанному Z.A. Aarden, 1987, Eur. J. Immunol, 71, 1411-1416. (Количество протеина NC30, присутствующее в образцах, не интерферирует с определением по линии B9 количеств IL-6, продуцируемых моноцитами). Определение IL-1 β осуществляют на клетках EL 4 по методу, описанному E.W. Palaszynski, 1987, Biochem. And Biophys. Res. Comm. 147, с. 204-211, который состоит в определении (количественно) конкуренции связывания с радиомаркированным IL-1 β ».

РАЗДЕЛ 15:

Выявление для протеина NC30 модуляции количества поверхностного антигена CD23 В - клетками миндалин

1) Используемый метод

а) Подготовка клеток

Человеческие миндалины извлекают путем хирургического вмешательства у девочки в возрасте 6 лет. Миндалины разрезают скальпелем в среде RPMI, охлажденной до 4°C. Увеличившиеся в объеме в среде после этой операции клетки отфильтровывают через марлю, чтобы получить гомогенную суспензию клеток. После двух промывок клетки подсчитывают и обрабатывают в плодной телячьей

сыворотке, содержащей 10% диметилсульфоксида (Мерк). По 7,5.10⁶ клеток в объеме 1 мл распределяют на каждую пробирку для замораживания. Клетки помещают в термостат с температурой -80°C на 24 часа, затем хранят в жидком азоте.

б) Инкубация клеток с протеином NC30

В день эксперимента, аликвоту клеток размораживают при 37°C, затем медленно разбавляют с помощью 50 мл среды RPMI, содержащей 10% плодной телячьей сыворотки. Клетки центрифугируют для удаления диметилсульфоксида. После подсчета клеток, 100 мкл суспензии клеток, доведенной до концентрации 4.10⁶ клеток/мл, наносят на микротитрационные планшеты с 96 лунками (NUNC).

Очищенный протеин NC30 в различных концентрациях добавляют в среду RPMI, содержащую 10% плодной телячьей сыворотки. 100 мкл среды с различными концентрациями протеина добавляют к клеткам в лунках для микрокультуры. Инкубацию осуществляют в течение 48 часов при 37°C в атмосфере, содержащей 5% диоксида углерода.

в) Маркировка клеток для иммунофлуоресценции

После инкубации, клетки переносят в микропробирки (Labsystem). Для обычного иммунофлуоресцентного анализа, к суспензии клеток добавляют 10 мкл анти-CD23-антитела в сочетании с флуоресцентноизотиоцианатом (ФИТИЦ) (Immunotech). Для анализа по методу двойных флуоресцирующих антител, к суспензии клеток одновременно добавляют 10 мкл анти-CD23-антитела в сочетании с фикоэритрином и 10 мкл анти-CD20-антитела в сочетании с ФИТИЦ (Becton Dickinson)

Инкубацию осуществляют в течение 30 минут при 4°C, затем клетки центрифугируют и осадок после центрифугирования обрабатывают с помощью 250 мкл охлажденного буфера 3ФР. С целью выявления клеток, погибших во время анализа, добавляют 50 мкл раствора пропидиума (Сигма) с концентрацией 20 мкг/мл.

г) Анализ с помощью проточной цитометрии

Образцы анализируют путем определения флуоресценции на триере (селекторе) клеток FacStar Plus (Becton Dickinson) с лазерной длиной волны возбуждения флуоресценции 488 нм. Во время анализа путем простой (обычной) иммунофлуоресценции

ции, эмиссии ФИТЦ и пропидиумиодида определяют при использовании, соответственно, интерференционных фильтров 530 нм и 630 нм. Во время анализа по методу двойных флуоресцирующих антител, дополнительную эмиссию, возникающую вследствие наличия фикоэритрина, улавливают через интерференционный фильтр 575 нм. В случае этого, указанного последним анализа используют электронную компенсационную систему для того, чтобы избежать контаминирования флуоресценции ФИТЦ в канале фикоэритрина, флуоресценции фикоэритрина в канале пропидиумиодида, и флуоресценции пропидиумиодида в канале фикоэритрина. Результаты собирают и обрабатывают, используя программное обеспечение LyS IS II (Becton Dickinson).

дидиумиодида в канале фикоэритрина. Результаты собирают и обрабатывают, используя программное обеспечение LyS IS II (Becton Dickinson).

2) Результаты

а) Модуляция количества антигена C123 в клетках миндалин за счет протеина NC30

Средние значения и стандартные отклонения полученных результатов представлены в нижеприводимой таблице 4 для инкубации клеток миндалин в течение 48 часов и диапазона концентраций протеина NC30 от 10^{-3} до 10^2 нг/мл.

ТАБЛИЦА 4

Изменение процента клеток миндалин, экспрессирующих антиген C/523, в присутствии различных концентраций протеина NC30

Концентрация NC30 (нг/мл)	% клеток, экспрессирующих CD23
0	4.8±1.2
10^{-3}	4.8±0.8
10^{-2}	4.9±0.4
10^{-1}	12±2.4
1	17.0±2.5
10	27.3±1.6
10^2	20.4±2.5

Устанавливают, что процент клеток миндалин, экспрессирующих антиген CD23 (рецептор слабого средства к IgE), является более значительным для концентрации протеина NC30 выше 10^1 нг/мл, чем процент, достигаемый в отсутствие протеина NC30. Самое значительное воздействие этого протеина установлено при концентрации 10 нг/мл.

б) Характеризация клеток, в которых протеин NC30 модулирует экспрессию антигена CD23

Характеризацию клеток, которые экспрессируют антиген GL23, осуществляют с помощью иммунофлуоресценции по методу двойных флуоресцирующих антител, используя антитело анти-CD23 в сочетании с фикоэритрином и антитело анти-CD20 в сочетании с ФИТЦ. Это, указанное последним, антитело направлено против рецептора, присутствующего только в клетках В. Анализ путем проточной цитометрии показывает, что фракция клеток В экспримирует антиген CD23 под действием протеина NC30.

РАЗДЕЛ 16:

Выявление воздействия протеина NC30 на пролиферацию линии гибридомы B9

Активность в отношении стимуляции пролиферации линии гибридомы B9 выявляют при использовании супернатантов культуры клеток COS, трансфектированных плазмидой pSEI-NC30 (см. Раздел 7), и очищенного протеина NC30, происходящего от дрожжей (см. Раздел 12). Эту линию обычно используют для осуществления биологического определения IL-6 (Z.A. Aarden, 1987, Eur. J.Immun., 17, 1411-1416).

1) - Используемый метод.

а) Принцип определения

Принцип этого определения описывается Т. Mosman, 1983, J.Immun. Methods, 65, 55-63, и кратко излагается ниже:

Митохондрии включают множественные дегидрогеназы, способные восстанавливать тетразолиевый цикл в формазан. Таким образом восстановленная соль этого типа, МТТ (3-4, 5-диметил-тиазол-2,5-дифенил-тетразолийбромид) дает синее окрашивание с сильным поглощением при 565 нм. Описанное здесь колориметрическое определение позволяет количественно измерять число митохондрий, следовательно, число клеток.

б) Культура клеток

Используемые клетки относятся к линии B9, представляющей собой линию гибридомы мышь/мышь, описанную Z.A. Aarden, 1987, Eur. J.Immun., 17, 1411-1416. Это неадгезивные клетки, которые пролиферируют в присутствии мышиного IL-6 или человеческого IL-6.

Культуральная среда

500 мл среды R PM1 1640 без глутамина (стандартное обозначение: 041 - 01870 M, Гибко)

+ 50 мл плодной телячьей сыворотки (декомплементированная, то есть нагретая в течение 30 минут при 55°C для инактивации фрагментов сывороточного компонента) (Сигма, стандартное обозначение: F4135)

+ 12,5 мл 100 mM пирувата натрия (стандартное обозначение: 043 - 013601I; Гибко)

+ 2,5 мл 1M Гепес, pH = 7,3 (стандартное обозначение: 043 - 05630D; Гибко)

+ 10 мл 200 мМ глутамин (стандартное обозначение: 043-05030⁺; Гибко)

Перед самым употреблением добавляют:

- β-меркаптоэтанол (Сигма; стандартное обозначение: М-6250), конечная концентрация 5×10^{-5} моль;
- IL-6 в конечной концентрации 500 пг/мл

в) Подготовка образцов:

Используют два типа образцов: один, получаемый из супернатанта клеток COS, либо трансфектированных плазмидой pSE1NC30 и культивированных как описано в Разделе 7, либо трансфектированных плазмидой pSE1 и культивированных в тех же условиях (контроль); другой, получаемый из раствора протеина NC30, происходящего от дрожжей, очищенный согласно Разделу 12, в концентрации 50 нг/мл.

г) Протокол определения

Определение осуществляют в культуральных планшетах с 96 лунками с плоским дном, причем каждый образец анализируют в ряду из 12 лунок в изменяемых концентрациях.

Клетки линии B9 культивируют, промывают 2 раза культуральной средой без IL-6, снова суспендируют в культуральной среде (без IL-6) и инкубируют в течение 2 часов при 37°C. Эта инкубация позволяет лучше удалить IL-6, ответственный за фон при определении. Наконец, клетки снова центрифугируют и суспендируют в вышеуказанной культуральной среде (без IL-6) в концентрации $2 \cdot 10^5$ клеток/мл.

В 96-луночные планшеты последовательно вносят:

- 50 мкл культуральной среды (без IL-6) в каждую лунку (за исключением первых лунок каждого ряда);
- 100 мкл испытуемого образца в первую лунку каждого ряда (с разбавлением в 2 раза от лунки к лунке);
- 50 мкл суспензии клеток в каждую лунку (10 000 клеток на лунку).

Планшеты затем помещают в термостат с температурой 37°C и содержащей 5% диоксида углерода атмосферой.

После инкубации в течение 3 дней, в каждую лунку в стерильных условиях добавляют 10 мкл раствора МТТ (Сигма, стандартное обозначение: 2128) с концентрацией 5 мг/мл в буфере ЗФР. Планшет снова помещают в термостат. С помощью микроскопа можно следить за появлением формазана, который продуцируется в виде синеватых кристаллов живыми клетками. По истечении четырех часов, клетки погибают, супернатант из каждой лунки осторожно отсасывают и кристаллы растворяют в 100 мкл 66 %-ного раствора н-пропанола, содержащего 10% додецилсульфата натрия и 0,04н HCl. Планшеты на несколько минут помещают на встряхиватель для планшетов, чтобы сделать однородным окрашивание. Затем считывание осуществляют с помощью

аппарата для прочтения планшетов при длине волны 565 нм.

Вместо вышеописанного определения с помощью МТТ также можно осуществлять подсчет клеток при использовании микроскопа.

2) Результаты

а) Супернатант клеток COS, содержащий протеин NC30

Проводят 6 серий измерений: 3 с различными супернатантами клеток COS, содержащими протеин NC30, и 3 с различными контрольными супернатантами клеток COS, с различными, для каждой серии, факторами разбавления раствора супернатанта COS.

Полученные результаты представлены на рисунке 6, на котором отражено изменение оптической плотности (каждая точка представляет собой среднюю величину оптической плотности, измеренную для одного и того же фактора разбавления в 3 сериях экспериментов) в зависимости от фактора разбавления раствора супернатанта COS.

При считывании данных этого рисунка устанавливают, что раствор супернатанта COS, содержащий протеин NC30, в 4-6 раз более активен в пролиферации линии B9, чем раствор контрольного супернатанта COS.

Активность в отношении стимулирования пролиферации линии B9, установленная при использовании раствора контрольного супернатанта COS, возникает вследствие эндогенного продуцирования IL-6 клетками COS, которое может быть количественно определено путем радиоиммунного анализа (РИА), особенно с помощью набора фирмы Амержам (стандартное обозначение: Р-ч РА 537). Этот радиоиммунный анализ позволяет подтвердить, что увеличение активности в отношении стимулирования пролиферации линии B9 (за счет супернатанта COS, содержащего протеин NC30) не связано со сверхпродуцированием IL-6 клетками COS.

б) Очищенный протеин NC30, происходящий от дрожжей:

Проводят две серии измерений: одну - в отношении оптической плотности после окрашивания с помощью МТТ; другую - в отношении плотности клеток путем подсчета клеток на микроскопе, с различными, для каждой серии, концентрациями протеина NC30.

Полученные результаты представлены на рисунке 7, на котором отражено изменение оптической плотности и плотности клеток в зависимости от концентрации протеина NC30, выраженной в нг/мл.

Устанавливают, что очищенный протеин NC30 стимулирует пролиферацию линии B9. ЭД50 (концентрация, при которой констатируют активность, равную половине полученной максимальной активности) составляет величину порядка 100 нг/мл.

Следует заметить, что клетки B9 являются мышечными клетками, что может объяснить необходимость использования повышенных концентраций протеина NC30 по сравнению с концентрациями, используемыми для воздействия на человеческие клетки (см. Разделы 14, 15 и 17).

РАЗДЕЛ 17:

Выявление воздействия протеина NC30 на пролиферацию мегакариобластической человеческой линии M07e

в присутствии GMCSF

Повышение пролиферативной активности GMCSF в отношении мегакариобластической человеческой линии M07e выявляют с помощью продуцированного в дрожжах протеина NC30 (Раздел

12). Эта линия клеток, описанная M.F. Brizzi и др., 1990, British Journal of Haematology, 76, 203-209, строго зависит в своем росте от цитокинов IL3 или GMCSF.

1) Используемый метод

а) Цель

Речь идет о сравнении пролиферации клеток линии M07e, культивированных либо в присутствии количества GMCSF, необходимого для половины максимальной пролиферации, либо в присутствии такого же количества GMCSF, к которой добавляют протеин NC30 в изменяемой концентрации.

б) Принцип определения

Пролиферацию клеток определяют путем измерения радиоактивности за счет включения содержащего тритий тимидина клетками культуры.

Пролиферирующие клетки используют тимидин для синтеза ДНК. Содержащий тритий тимидин, вводимый в культуру, вступает в конкуренцию с нерадиоактивным тимидином среды и включается в клетки.

Спустя определенное время, клетки рекуперировать на фильтре и, для удаления избытка содержащего тритий тимидина, не внедренного в клетки, промывают. Каждый фильтр затем анализируют с помощью гамма-счетчика. Пролиферативную активность выражают в виде числа импульсов в минуту внедренного, содержащего тритий тимидина.

в) Культура клеток

Используемые клетки относятся к линии M07e, которая представляет собой мегакариобластическую человеческую линию, установленную M.F. Brizzi и др. (цитировано выше). Это неадгезивные клетки, которые пролиферируют в присутствии человеческого IL-3 или человеческого GMCSF. Половина полученной максимальной активности (ED_{50}) составляет:

35 пг/мл для GMCSF (Genzyme; стандартное обозначение: RM-CSF-C);

0,7 пг/мл для IL3 (Genzyme; стандартное обозначение: HIL3-C).

Культуральная среда

- 500 мл среды Дульбекко, модифицированной по способу Исков (среда IM DM⁺ Гибко; стандартное обозначение: 04101980);

- 50 мл плодной телячьей сыворотки (декомплементированная, то есть нагретая при 55°C в течение 30 минут для инактивации фрагментов сывороточного компонента) (Сигма; стандартное обозначение: F 4135);

+ 10 мг/мл Гентамицина (1 мл раствора Гибко с стандартным обозначением: 043. 05710 D).

Перед самым употреблением добавляют человеческий рекомбинантный IL3 (Genzyme; стандартное обозначение: HIL3-C) в конечной концентрации 4 нг/мл.

г) Подготовка образцов

Испытуемые образцы готовят (путем разбавления в культуральной среде без IL3) из раствора протеина NC30, происходящего из дрожжей и очищенного согласно Разделу 12, в концентрации 500 нг/мл.

д) Протокол определения

Определение осуществляют в культуральных планшетах с 96 лунками с плоским дном, причем каждый образец анализируют в ряду из 12 лунок при использовании изменяемых концентраций. Культивируемые клетки линии M07e должны находиться в экспоненциальной фазе роста.

Для определения, клетки промывают 2 раза культуральной средой без IL3- и инкубируют в течение 3 часов при 37°C. Эта инкубация позволяет лучше удалить IL3, ответственный за фон при определении. Наконец, клетки снова центрифугируют и снова суспендируют в вышеуказанной культуральной среде (без IL3) в концентрации $2 \cdot 10^5$ клеток/мл.

В планшеты с 96 лунками последовательно вносят:

- либо 50 мкл культуральной среды (без IL3) в каждую лунку;
- либо 50 мкл культуральной среды (без IL3) и 10 мкл раствора GMCSF с концентрацией 200 пг/мл;
- либо 50 мкл испытуемого образца в различных концентрациях и 10 мкл раствора GMCSF с концентрацией 200 пг/мл;
- затем 50 мкл суспензии клеток, в каждую лунку (10 000 клеток/лунка).

Планшеты затем помещают в термостат с температурой 37°C и атмосферой, содержащей 5% диоксида углерода.

После инкубации в течение 3 дней, в каждую лунку, в стерильных условиях, добавляют 50 мкл раствора содержащего тритий тимидина (10 микрокюри/мл) (Амерсхам; стандартное обозначение: TRA6 = 1 милликюри/мл - 10 микрокюри/мл) в культуральной среде без IL3. Планшет помещают в термостат. По истечении 4 часов содержимое каждой лунки наносят на фильтр путем отсасывания из лунок и промывают дистиллированной водой и измеряют радиоактивность фильтра.

2) Результаты

Основные полученные результаты представлены в нижеприводимой таблице 5, в которой указываются значение радиоактивности, выраженное числом импульсов в минуту, для среды без GMCSF и без протеина NC30 к величина радиоактивности для среды, содержащей 18 нг/мл GMCSF, в зависимости от концентрации протеина NC30.

Представленные здесь величины радиоактивности являются средними значениями из 11 опытов для среды без GMCSF, также, как для среды, содержащей только GMCSF, и из 7 опытов для сред, содержащих GMCSF и протеин NC30. Значения этих средних величин сравнивают, используя критерий

Стюдента, со степенью достоверности выше 99,95%.

ТАБЛИЦА 5
Радиоактивность в зависимости от концентрации
протенна NC30

Концентрация протенна NC 30 (нг/мл)	0	0,49	1,95	7,8	31,2	125	500
радиоактивность (число импульсов в минуту) для среды без GMCSF	550	/	/	/	/	/	/
Радиоактивность (число импульсов в минуту для среды, содержащей 18 нг/мл GMCSF	14462	16852	18840	20264	20549	20685	21784
Значительное отклонение с вероятностью > 99,95%	/	нет	да	да	да	да	да

Из вышеприведенной таблицы следует, что протени NC30 значительно увеличивает пролиферацию линии M07e в присутствии GMCSF.

РАЗДЕЛ 18:

Выявление для протенна NC30 хемотаксисной активности

1) Используемый метод

а) Выделение нейтрофилов

Из периферической крови удаляют большую часть эритроцитов путем осаждения при 37°C в течение 30 минут в растворе, содержащем 0,6% декстрана T500 (Фармация; стандартное обозначение: 17-0320-01) и 0,09% хлорида натрия. Затем клетки помещают поверх слоя Ficoll-Paque (Фармация) и центрифугируют в течение 30 минут при 400 g. Мононуклеарные клетки периферической крови (RBMNC) находятся на границе раздела между Ficoll и супернатантом, тогда как остаточные эритроциты и лейкоцитарные элементы (в основном нейтрофилы) находятся в осадке клеток. Этот осадок снова суспендируют в 0,8% растворе хлорида аммония в 10 mM Гепес и инкубируют в течение 7 минут при 37°C для деструкции эритроцитов. Остаточные клетки (в основном нейтрофилы) центрифугируют и промывают в буфере HBSS: сбалансированный солевой раствор Хенкса (Гибко B2L; стандартное обозначение: 041-04025 II), называемый ниже раствор HBS5.

б) Выделение моноцитов

Принцип выделения моноцитов описывается A.Boyum, 1983, Scan.J.Immunol., 17, 429-436. Ниже приводится его краткое изложение: Метод заключается в выделении моноцитов из крови при использовании среды с содержащим иод градиентом, Nycodenz (N,N'-бис(2,3-дигидроксипропил)-5-N-(2,3-дигидроксипропил) ацетамидо/-2,4,6-трипизофталамид). Для усиления различия в плотности между моноцитами и лимфоцитами, повышают осмолярность раствора, следовательно, лимфоциты теряют воду и становятся более плотными. Можно использовать среду "Nycoprep 068", которая содер-

жит Nycodenz, хлорид натрия и трицин/NaOH в оптимальных концентрациях, для выделения моноцитов (Nycomed Pharma AS, Норвегия; стандартное обозначение: 223510).

Используемым протоколом (методикой) является следующий:

Из периферической крови удаляют большую часть эритроцитов путем осаждения при 37°C в течение 30 минут в растворе, содержащем 0,6% декстрана и 0,09% хлорида натрия. Отбирают верхнюю фазу плазмы, содержащей моноциты, лимфоциты и нейтрофилы. Для отделения моноцитов от других клеток готовят пробирки следующим образом:

6 мл плазмы помещают на слой из 3 мл Nycoprep.

1.068 (Nycomed Pharma AS, Норвегия; стандартное обозначение: 223510) в пробирке диаметром 13 - 14 мм. После центрифугирования при 600 g в течение 15 минут, отбирают осветленную плазму на 3 - 4 мм выше промежуточной фазы и собирают остаток плазмы и весь раствор Nycoprep вплоть до примерно на 1 см выше осадка клеток, что позволяет не отбирать лимфоциты. Собранную суспензию моноцитов дополняют до объема 6 - 7 мл с помощью раствора следующего состава: 0,9% хлорида натрия, 0,13 % ЭДТК, 1% бычьего сывороточного альбумина, затем центрифугируют в течение 7 минут при 600 g.

Моноциты загрязнены тромбоцитами. Для удаления тромбоцитов центрифугируют, затем отбирают супернатант и снова суспендируют в том же растворе, повторяя эти операции 3 раза.

Клетки суспендируют снова в среде SPM1 1640 (Гибко), содержащей бычий сывороточный альбумин (BSA) в количестве 0,5%.

в) Протокол выявления хемотаксиса

Используемым тестом является таковой, описанный W.Falk и др., 1980.

J.Imm.Meth.33, 239-247. Ниже приводится конкретно используемый протокол (методика):

Для определения хемотаксиса используют модифицированную камеру Бойдена, выпускаемую в продажу фирмой Neuroprobe (стандартное обозначение: AP48).

Испытуемые образцы, разбавленные в растворе HB55 для тестов на нейтрофилы, и в среде RPMI, содержащей 0,5% бычьего сывороточного альбумина для тестов на моноциты, помещают в лунки нижнего планшета. На него помещают поликарбонатную мембрану (размер пор: 5 мкм; Nuclerope: стандартное обозначение: 155845) глянцевой стороной вниз. На мембрану помещают верхний планшет. Клетки (50 000 на 50 мкл буфера) вносят в лунки верхнего планшета. Камеру инкубируют при 37°C в термостате, содержащем влагу, или в содержащем смоченную вату кожухе (une boîte, в течение 1 часа для теста на нейтрофилы и в течение 3 часов для теста на моноциты. Мембрану вынимают и удаляют клетки, которые находятся на матовой стороне (клетки, которые не мигрировали), путем осушения мембраны и скребления ее с помощью скребка из каучука, причем эти две последние операции повторяют 1 раз. Мигрировавшие клетки окрашивают и фиксируют, используя набор "Diff-quick" (Dade; стандартное обозначение: 130832). Путем наблюдения в микроскоп подсчитывают

число клеток с глянцевой стороны мембраны (мигрировавшие клетки).

Затем рассчитывают индекс хемотаксиса образца по отношению к рассматриваемым клеткам (моноциты или нейтрофилы), который определяют как соотношение числа мигрировавших в образец клеток к числу клеток, которые в контрольном эксперименте мигрировали в среду или буфер для разбавления.

3) Подготовка образцов

а) Образцы рекомбинантного протеина NC30: протеин NC30, происходящий от дрожжей, очищенный, как описано в Разделе 12, в концентрациях 0,1, 1, 10 и 100 нг/мл.

б) Контроль

пептид формил-Met-Leu-Phe, обычно называемый fMLP (Сигма; стандартное обозначение: F 3506), в концентрации 1 мкмоль (концентрация, обычно используемая для применения в качестве положительного контроля хемотаксиса).

4) Результаты:

Основные полученные результаты представлены в нижеприводимой таблице 6, в которой указывается индекс хемотаксиса по отношению к моноцитам и индекс хемотаксиса по отношению к нейтрофилам для протеина NC30 в различных концентрациях и контроля –fMLP. Этот индекс рассчитывают из среднего из четырех независимых экспериментов.

Таблица 6

Протеин NC30 (нг/мл)	Индекс хемотаксиса по отношению к моноцитам	Индекс хемотаксиса по отношению к нейтрофилам
0.1	2.2	0.6
1	4.1	1.0
10	6.1	1.2
100	5.1	1.1
fMLP (1 мкмоль)	3.0	3.8

Устанавливают, что в испытуемых концентрациях, протеин NC30 не оказывает значительного воздействия на нейтрофилы, но в концентрации 1, 10 и 100 нг/мл он имеет индекс хемотаксиса по отношению к моноцитам отчетливо выше такового fMLP.

Протеин NC30, следовательно, является сильным и специфичным хемотактантом для моноцитов.

РАЗДЕЛ 19:

Иммуномодуляторная активность in vivo в случае мыши

Происходящий от дрожжей, очищенный протеин NC30 испытывают на его иммуномодуляторную активность в двух системных инфекционных моделях в случае мыши.

1) Материал и метод

а) Животные

Для этого исследования используют самок мышей CD1, поставляемых C. River (Франция), со средней массой 25 г. Используемые группы включают 8 или 10 мышей.

б) Бактериальные штаммы

Инфекционными штаммами являются штамм *Zisteria monocytogenes*, депонированный в Коллекции Института Пастера под номером CIP 5734, и штамм *E.coli*, клинический изолят, хранящийся при -70°C.

в) Образцы

Протеин NC30, происходящий от дрожжей, очищенный, как описано в Разделе 12, используют разбавленным в 0,15 М раствора хлорида натрия, содержащем 1 объемн.% мышиной плазмы. Этот раствор служит контролем.

г) Обработка мышей

После распределения мышей на несколько групп, вводят протеин NC30 интраперитонеально в дозах 2 и 20 мкг/кг, в интервалы времени за 24 или 4 часа до инфекции. Контрольную группу обрабатывают разбавителем.

д) Инфекционные модели

Используют две инфекционные септицемические модели, применяя штаммы *E.Coli* и *L.monocytogenes*. Эти модели описываются Kong-Tek-Chang, 1987, *Infection and Immunity*, 55, с. 668-

673; и M.Haak-Frendscho и др. Infection and Immunity, 1989, 57, с. 3014-3021.

Штаммы E.coli и L.vijncytoenes культивируют в питательном бульоне (Nutrient Broth, Oxoid) в течение 18 часов при 37°C. Объем 0,5 мл соответствующего разбавления культурального бульона, соответствующего 5×10^6 UFC (образующая колонию единица) вводят мышам интраперитонеально. Ежедневно вплоть до десятого дня регистрируют гибель мышей в различных группах.

е) Статистика

Число выживших мышей, обнаруживаемое в обработанных группах, сравнивают с таковым контрольной группы с помощью теста khi 2. Различия считают значительным, когда вероятность выше 95%.

2) Результаты

а) Инфекция с помощью L.Monocytogeneses.

Группы мышей, обработанные интраперитонеально в интервалы времени Т за 24 или 4 часа до инфекции с помощью 2 или 20 мкг/кг протеина NC30, ведут себя как контрольные группы. Не установлено никакого улучшения степени выживания.

б) Инфекция с помощью E.Coli.

Результаты представлены в нижеприводимой таблице 7, в которой указывается доля выживших мышей в подвергающихся испытанию группах:

Число выживших мышей / число мышей, инфицированных с помощью E.Coli в зависимости от дозы протеина NC30 и интервала времени Т, отделяющего обработку от инфекции

ТАБЛИЦА 7

Т	24 часа	4 часа		
Доза (мкг/кг)	Пример 1	Пример 1	Пример 2	Пример 3
0 (контроль)	3/8	1/10	1/8	2/8
2	3/8	5/8*	3/8	2/8
20	7/8*	не опред.	5/8*	3/8

*значительное различие по сравнению с контролем с вероятностью выше 95%.

Устанавливают:

Мыши, обработанные интраперитонеально за 24 часа до инфекции с помощью 20 мкг/кг протеина NC30, значительно лучше устойчивы к микробной инфекции, чем мыши контрольной группы.

Профилактическая обработка, осуществляемая за 4 часа до инфекции интраперитонеально, эффективна в двух из трех реализуемых экспериментов и позволяет значительно повысить степень выживания обработанных животных по сравнению с таковой контрольных животных. В первом эксперименте эффективна только одна испытываемая доза 2 мкг/кг. Во втором эксперименте одна доза 20 мкг/кг защищает мышей от инфекции с помощью E.coli.

В другой серии экспериментов, осуществляемых на группах из 20 мышей, устанавливают, что доза 32 мкг/кг протеина NC30, происходящего от дрожжей, очищенного как описано в Разделе 12, вводимая за 24 часа до инфекции с помощью E.coli, позволяет достигать отчетливо более значительной степени выживания мышей: 11 из 20 по сравнению с

2 из 20 в случае контроля. Установленное различие является значительным с вероятностью выше 99%, согласно критерию Стьюдента.

Протени NC30, следовательно, также *ин vivo* обладает иммуномодуляторным эффектом.

Протени NC30, следовательно, является новым лимфокином, обладающим иммуномодуляторными активностями цитокинового типа *ин vitro* (пролиферация клеток, клеточная активация, хемотаксис и регуляция синтеза других цитокинов) и *ин vivo*. Он оказывает воздействие, по крайней мере, на два типа ключевых клеток относящихся к иммунитету системы: моноциты и В-лимфоциты. Следовательно, речь идет о новом интерлейкине. Некоторые из его свойств являются общими с интерлейкином-4: ингибирование синтеза интерлейкина-1А и интерлейкина-б человеческими моноцитами периферической крови, активированными с помощью ЛПС, и модуляция экспрессии антигена CD23 в В-лимфоцитах миндалин. (W.Paul, 1991, Blood, 77 1959; и Waal Malefyt и др., 1991, J. Exp., Med., 174., 1199-1220).

Формула изобретения

1. Протени, обладающий цитокиновой активностью, отличающийся тем, что он включает последовательность (a₁):

Gly Pro Val Pro Pro Ser Thr Ala Leu Arg Glu Leu Ile Glu Glu Leu
 1 5 10 15
 Val Asn Ile Thr Gln Asn Gln Lys Ala Pro Leu Cys Asn Gly Ser Met
 20 25 30
 Val Trp Ser Ile Asn Leu Thr Ala Xaa Met Tyr Cys Ala Ala Leu Glu
 35 40 45
 Ser Leu Ile Asn Val Ser Gly Cys Ser Ala Ile Glu Lys Thr Gln Arg
 50 55 60
 Met Leu Ser Gly Phe Cys Pro His Lys Val Ser Ala Gly Gln Phe Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu His Val Arg Asp Thr Lys Ile Glu Val Ala Gln Phe Val Lys
 85 90 95
 Asp Leu Leu Leu His Leu Lys Lys Leu Phe Arg Glu Gly Arg Phe Asn
 100 105 110

в которой Xaa означает Asp или Gly,

или последовательность, имеющую степень гомологии по меньшей мере 80% с последовательностью (α_1).

2. Протеин по п. 1, **отличающийся тем, что** он включает непосредственно выше последовательности (α_1) последовательность:

Ser Pro.

3. Протеин по любому из п.п. 1 и 2, **отличающийся тем, что** он имеет молекулярную массу около $9,0 \pm 2$ к а

4. Протеин по любому из п. п. 1 и 2, **отличающийся тем, что** он имеет молекулярную массу около $16,0 \pm 2$ к а.

5. Протеин по любому из п. п. 1 и 2, **отличающийся тем, что** он N-гликозилирован.

6. Рекombинантная ДНК, **отличающаяся тем, что** она кодирует протеин по любому из п. п. 1 и 2 или предшественник протеина по любому из п.п. 1 и 2.

7. Рекombинантная ДНК, по п. 6 **отличающаяся тем, что** она кодирует предшественник протеина по любому из п.п. 1 и 2, который включает сигнальную последовательность.

8. Рекombинантная ДНК по п. 7, **отличающаяся тем, что** кодирующая зрелый протеин последовательность включает следующую последовательность (NaI).

GGCCCTGTGC CTCCCTCTAC AGCCCTCAGG GAGCTCATTG
 AGGAGCTGGT CAACATCACC CAGAACCAGA AGGCTCCGCT
 CTGCAATGGC AGCATGGTAT GGAGCATCAA CCTGACAGCT
 GACATGTACT GTGCAGCCCT GGAATCCCTG ATCAACGTGT
 CAGGCTGCAG TGCCATCGAG AAGACCCAGA GGATGCTGAG
 CGGATTCTGC CCGCACAAGG TCTCAGCTGG GCAGTTTTC
 AGCTTGCATG TCCGAGACAC CAAAATCGAG GTGGCCCCAGT
 TTGTAAAGGA CCTGCTCTTA CATTTAAAGA AACTTTTTCG
 CGAGGGACGG TTCAAC

9. Рекombинантная ДНК по п. 7, **отличающаяся тем, что** кодирующая зрелый протеин последовательность

включает следующую последовательность (NaI):

GGCCCTGTGC CTCCCTCTAC AGCCCTCAGG GAGCTCATTG
 AGGAGCTGGT CAACATCACC CAGAACCAGA AGGCTCCGCT
 CTGCAATGGC AGCATGGTAT GGAGCATCAA CCTGACAGCT
 GGCATGTACT GTGCAGCCCT GGAATCCCTG ATCAACGTGT
 CAGGCTGCAG TGCCATCGAG AAGACCCAGA GGATGCTGAG
 CGGATTCTGC CCGCACAAGG TCTCAGCTGG GCAGTTTTC
 AGCTTGCATG TCCGAGACAC CAAAATCGAG GTGGCCCCAGT
 TTGTAAAGGA CCTGCTCTTA CATTTAAAGA AACTTTTTCG
 CGAGGGACGG TTCAAC

10. Рекомбинантная ДНК по любому из п.п. 7-9, отличающаяся тем, что сигнальной последовательностью является последовательность, выбирае-

мая из следующих последовательностей (б 1), (б 2), (б 3) и (б 4):

(b1)

```
Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
  1           5           10          15
Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
          20          25          30
```

(b2)

```
Met His Pro Leu Leu Asn Pro Leu Leu Leu Ala Leu Gly Leu Met Ala
  1           5           10          15
Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly Phe Ala
          20          25          30
Ser Pro
```

(b3)

```
Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
  1           5           10          15
Phe Ala
```

(b4)

```
Met Ala Leu Leu Leu Thr Thr Val Ile Ala Leu Thr Cys Leu Gly Gly
  1           5           10          15
Phe Ala Ser Pro
          20
```

11. Рекомбинантная ДНК по п. 10, отличающаяся тем, что кодирующую сигнальный пептид нуклеотидную последовательность выбирают сре-

ди следующих последовательностей (Nb 1), (Nb 2), (Nb 3) и (Nb 4):

(Nb1)

```
ATGCATCCGC TCCTCAATCC TCTCCTGTTG GCACTGGGGCC
TCATGGCGCT TTTGTTGACC ACGGTCATTG CTCTCACTTG
CCTTGGCGGC TTTGCC
```

(Nb2)

```
ATGCATCCGC TCCTCAATCC TCTCCTGTTG GCACTGGGGCC
TCATGGCGCT TTTGTTGACC ACGGTCATTG CTCTCACTTG
CCTTGGCGGC TTTGCCTCCC CA
```

(Nb3)

```
ATGGCGCTTT TGTGACCAC GGTCAATTGCT CTCACTTGCC
TTGGCGGCTT TGCC
```

(Nb4)

```
ATGGCGCTTT TGTGACCAC GGTCAATTGCT CTCACTTGCC
TTGGCGGCTT TGCCTCCCA
```

12. Вектор экспрессии, отличающийся тем, что он включает рекомбинантную ДНК по любому из п.п. 6-11.

13. Эукариотические клетки, отличающиеся тем, что они содержат, с необходимыми для их экспрессии средствами, рекомбинантную ДНК по любому из п.п. 6-11.

14. Эукариотические клетки по п. 1, отличающиеся тем, что они представляют собой клетки животных.

15. Клетки животных по п. 14, отличающиеся тем, что они содержат вектор экспрессии по п. 12.

16. Клетки животных по п. 15, отличающиеся тем, что они представляют собой клетки яичника китайского хомячка (СНО).

17. Клетки животных по п. 15, **отличающиеся тем, что** они представляют собой клетки почек обезьяны (COS).

18. Эукариотические клетки по п. 13, **отличающиеся тем, что** они представляют собой дрожжевые клетки.

19. Прокариот, **отличающийся тем, что** он трансформирован экспрессирующим вектором по п. 12.

20. Прокариот по п.21, **отличающийся тем, что** он относится к виду E.coli.

21. Способ получения протенина по любому из п.п. 1-5, **отличающийся тем, что** он включает стадию культивирования животных клеток по любому

из п.п. 14-17, затем стадии выделения и очистки рекомбинантного протенина.

22. Способ получения протенина по любому из п.п. 1-5, **отличающийся тем, что** он включает стадию культивирования дрожжевых клеток по п. 18, затем стадии выделения и очистки рекомбинантного протенина.

23. Лекарственное средство, **отличающееся тем, что** оно содержит протенин по любому из п.п. 1-5.

Компьютерный набор: Абидова П.А.

Заказ

Тираж

Подписное

Национальный патентно-информационный центр
734042, г. Душанбе, ул. Айни, 14 а.