

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 63285 B2



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

7(51) C 12 P 21/06  
C 12 P 21/02  
C 12 P 21/04  
C 12 N 15/00  
C 12 N 15/12

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 96058  
(22) Заявено на 13.03.92  
(24) Начало на действие  
на патента от: 23.06.2000

Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в  
бюлетин № на  
(45) Отпечатано на 31.08.2001  
(46) Публикувано в бюлетин № 8  
на 31.08.2001  
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприетел(и):  
AMGEN INC., THOUSAND OAKS, CA (US)

(72) Изобретател(и):  
Lawrence M. Souza, Thousand Oaks, CA (US)

(74) Представител по индустриална  
собственост:  
Фани Владимирова Божинова,  
1000 София, п.к. 728

(86) № и дата на PCT заявка:

(87) № и дата на PCT публикация:

Издава се съгласно §4 от Преходните и заключителните разпоредби на Закона за патентите на основание издаден патент на: US № 4999291 от 12.03.91

(54) ПОЛУЧАВАНЕ НА ЧОВЕШКИ ПЛУРИПОТЕНТЕН ГРАНУЛОЦИТЕН КОЛОНИЯ-СТИМУЛИРАЩ ФАКТОР

(57) Изобретението се отнася до нови полипептиди, притежаващи част или цялата първична структурна конформация и едно или повече биологични свойства на плурипотентен гранулоцитен колония-стимулиращ фактор (hrG-CSF) от бозайник. Те се характеризират с предпочитани форми като продукт на прокариотна и еукариотна експресия в гостоприемник на екзогенна ДНК последователност. Последователности, кодиращи част или цялата последователност на аминокиселинните остатъци на hrG-CSF или на негови аналози, се инкорпорират в автономно репликиращ се плазмид или вирусни вектори, използвани за трансформиране или трансфектиране на подходящи клетки на прокариотни или еукариотни гостоприемници като бактерии, дрожди или клетъчни култури от гръбначни. Продуктите на експресията на ДНК последователностите показват физичните и имунологичните свойства и in vitro биологични активности на изолати от hrG-CSF, произлизащи от естествени източници. Изобретението се отнася и до химически синтезирани полипептиди, споделящи биохимичните и имунологичните свойства на hrG-CSF.

5 претенции, 1 фигура

BG 63285 B2

(54) ПОЛУЧАВАНЕ НА ЧОВЕШКИ ПЛУРИПОТЕНТЕН  
ГРАНУЛОЦИТЕН КОЛОНИЯ-СТИМУЛИРАЩ ФАКТОР

Настоящото е продължение на заявка Ser. No 835,548 подадена на 03.03.1986, понастоящем патент на САЩ No 4,810,643; на свой ред частично продължение на заявка на САЩ Ser No 768,959, подадена на 23.08.1985, понастоящем изоставена.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Настоящото изобретение принадлежи най-общо към хематопоеитичните растежни фактори и към полинуклеотиди, кодиращи такива фактори. Настоящата заявка по-точно принадлежи към плурипотентни гранулоцитни колония-стимулиращи фактори на бозайници, по-точно плурипотентен гранулоцитен колония-стимулиращ фактор на човек (hpG-CSF), негови фрагменти и полипептидни аналози и към кодиращи го полинуклеотиди.

Човешката система, образуваща кръв (хематопоеична система), замества голямо разнообразие бели кръвни клетки (включително неутрофили, макрофаги и базофили/мастоцити), червени кръвни клетки (еритроцити) и клетки, образуващи съсиреци (мегакариоцити/тромбоцити). Определя се, че хематопоеичната система на средностатистическия човек продуцира в границите на  $4,5 \times 10^{11}$  гранулоцити и еритроцити всяка година, което е еквивалентно на годишно заместване на цялото телесно тегло. Dexter et al; BioEssays, 2, 154-158 (1985).

Счита се, че малки количества от някои хематопоеични растежни фактори отговарят за диференцирането на малко количество родителски "стволови клетки" в голям брой клетъчни линии за огромната пролиферация на тези линии и за последната диференциация на зрели кръвни клетки от тези линии. Тъй като хематопоеичните растежни фактори присъстват в изключително малки количества, откриването и идентифицирането на тези фактори се основава на определен кръг изследвания, който все още само разграничава различните фактори на основата на ефектите на стимулиране върху култивирани клетки при изкуствени условия. В резултат на това, голям брой имена са измислени за обозначаване на много по-малък брой фактори. Като пример за получаваните грешки, термините IL-3, BPA, multi-CSF, HCGF, MCGF и PSF всички са акроними, за които се счита понастоящем, че се прилагат за единичен миши хематопоеичен растежен фактор. Metcalf, Science, 229, 16-22 (1985). Виж също Burgess, et al. J.Biol. Chem., 252, 1988 (1977), Das, et al. Blood, 58, 600 (1980) Ihle, et al., J.Immunol., 129, 2431 (1982), Nicola, et al., J.Biol.

Chem 258, 9017 (1983), Metcalf et al., Int. J. Cancer, 30, 773 (1982), и Burgess et al. Int. J. Cancer, 26, 647 (1980), отнасящ се до различни миши растежни регулаторни гликопротеини.

Заявката за рекомбинанти генетични техники е внесла известен ред в този хаос. Например, получени са аминокиселинните и ДНК последователности на човешки еритропоетин, който стимулира продуцирането на еритроцити. (виж Lin, PCT published Application No 85/02610, публикувана на 20.06.1985.) Рекомбинантни методи са били прилагани за изолиране на сДНК за човешки гранулоцит-макрофаг колония-стимулиращ фактор. Виж Lee, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82, 4360-4364 (1985) и Wong, et al., Science, 228, 810-814 (1985). Виж също Yokota, et al. proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 81, 1070 (1984), Fung, et al., Nature, 307, 233 (1984) и Gough, et al, Natura, 309, 763 (1984) отнасящи се до клониране на миши гени, както и Kawasaki, et al., Science, 230, 291 (1985) отнасящи се до човешки M-CSF.

За човешки хематопоеичен растежен фактор, наречен човешки плурипотентен колония-стимулиращ фактор (hpCSF) или плурипоетин е показано, че присъства в културалната среда на човешка клетъчна линия на карцином на пикочния мехур, означена като 5637 и депозирана при рестриктивни условия в American Type Culture Collection, Rockville, Md. Като А.Т.С.С. номер на депозиране НТВ-9. За hpCSF пречистен от тази клетъчна линия е докладвано, че стимулира пролиферацията и диференциацията на плурипотентни родителски клетки, което води до продуциране на всички големи типове клетки на кръвта при изследвания, използващи човешки родителски клетки от костен мозък. Welte et al., Proc.

Natl. Acad. Sci. (USA), 82, 1526-1530 (1985). Пречиштането на hrCSF използва:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  утаяване; анионообменна хроматография (DEAE целулоза, DE52); Гел филтрация (AcA54 колона); и C18 обратнофазова високо ефективна течна хроматография (BETX). Протеин, идентифициран като hrCSF, който се елуира при втория от два пика на активност при C18 обратнофазова BETX фракция е докладван, че има молекулно тегло (MW) от 18,000, както е определено от натриев додецил сулфат (SDS) – полиакриламидна гел електрофореза (PAGE), използваща оцветяване със сребро. По-рано е докладвано за hrCSF, че притежава изоелектрична точка от 5,5 [Welte et al., J. Cell. Biochem., Supp 9A, 116 (1985)] и висока диференцираща активност за миша миеломоноцитна левкемична клетъчна линия WEHI-3B D<sup>+</sup> [Welte, et al., UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Gale, et al., eds., New Series, 28 (1985)]. Предварителните изследвания показват, че факторът, идентифициран като hrCSF, има предимно гранулоцитна колония-стимулираща активност по време на първите седем дни при изследване на човешки CFU-GM.

Друг фактор, означен като човешки CSF- $\beta$ , също е бил изолиран от човешка клетъчна линия 5637 от рак на пикочния мехур и е описан като влизащ в съревнование с миши <sup>125</sup>I-белязан гранулоцитен колония-стимулиращ фактор (G-CSF) за свързване на WEHI-3B D<sup>+</sup> клетки в доза-отговор взаимоотношение, идентично на това на небелязан миши G-CSF [Nicola, et al., Nature, 314, 625-628 (1985)]. Преди това е докладвано, че това доза-отговор взаимоотношение е единствено за небелязан миши G-CSF и не се притежава от

такива фактори като M-CSF, GM-CSF, или multi-CSF [Nicola, et al., Proc.Natl.Acad.Sci. (USA), 81,3765-3769 (1984)]. CSF- $\beta$  и G-CSF също са единствени сред CSF-ите по това, че споделят висока степен на способност да индуцират диференциация на WEHI-3B D<sup>+</sup> клетки Nicola, et al., Immunology Today , 5, 76-80 (1984). При високи концентрации G-CSF стимулира смесени гранулоцит/макрофаг колония-образуващи клетки. [Nicola, et al., (1984) по-горе], което отговаря на предварителните резултати, сочещи появата на гранулоцитни, моноцитни, смесени гранулоцитни/моноцитни и еозинофилни колонии (CSFU-GEMM) след 14 дни инкубиране на култури от човешки костен мозък с hpCSF. CSF- $\beta$  също се описва като стимулиращ образуването на неутрофилни гранулоцитни колонии при изследвания, които използват клетки от миши костен мозък, свойство, което е критерий за идентифициране на фактор като G-CSF. На основата на тези прилики човешки CSF- $\beta$  се идентифицира като G-CSF (гранулоцитен колония-стимулиращ фактор). Nicola et. al., Nature, 314, 625-628 (1985).

На основата на техните общи свойства става ясно, че човешки CSF- $\beta$  от Nicola et al., по-горе, и hpCSF от Welte, et al., по-горе, са един и същ фактор, който може правилно да се посочи като човешки плурипотентен гранулоцитен колония-стимулиращ фактор (hpG-CSF). Охарактеризирането и рекомбинантното продуциране на hpG-CSF е изключително желано с оглед на съобщената способност на миши G-CSF напълно да подтиска *in vitro* WEHI-3B D<sup>+</sup> левкемична клетъчна популация при "почти нормални концентрации" и съобщената способност на свежи, инжектирани препарати от миши G-CSF да подтискат установените трансплантирани миелоидни

левкемии при мишка. Metcalf, Science, 229, 16-22 (1985). Виж също Sachs, Scientific American, 284(1), 40-47 (1986).

В обхвата, в който hpG-CSF може да докаже, че е терапевтично значим и следователно има необходимост да бъде достъпен в количества за търговската мрежа, изолирането от клетъчни култури не е възможно да осигури адекватен изходен материал. Забележително е например, че изглежда съществуват ограничения срещу търговското използване на клетки от Човешка Туморна Банка, като човешка клетъчна линия от карцином на пикочен мехур 5637 (A.T.C.C. HTB9), която е докладвана във Welte et. al., (1985) по-горе, като естествен източник на hpCSF изолати.

#### ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Съгласно настоящето изобретение се предоставят ДНК последователности, кодиращи цял или част от hpG-CSF. Такива последователности могат да включват: инкорпориране на кодони, "предпочитани" за експресия от избрани безгръбначни гостоприемници; предвиждането на сайтове за разцепване от рестрикционни ендонуклеазни ензими; и осигуряването на допълнителни първоначални терминални или междинни ДНК последователности, което улеснява конструирането на бързо експресирани вектори. Настоящото изобретение предоставя също така ДНК последователности, кодиращи за микробиална експресия на полипептидни аналози или производни на hpG-CSF, които се различават от естествено съществуващите в природата форми по идентичност или месторазположение на един или повече аминокиселинни остатъци (т.е. делеционни аналози, съдър-

жащи по-малко от всички други остатъци, определени за hpG-CSF; аналози със замествания като [Ser<sup>17</sup>] hpG-CSF, при които един или повече определени остатъци се заместват с други остатъци; и аналози с прибавяне, при които един или повече аминокиселинни остатъци се прибавят към краен или среден участък на полипептида) и които споделят едно или повече свойства на естествено съществуващите в природата форми.

Новите ДНК последователности на изобретението включват последователности, полезни за осигуряване на експресията в прокариотни или еукариотни клетки гостоприемници на полипептидни продукти, притежаващи поне част от първоначалната структурна конформация и едно или повече от биологичните свойства на естествено съществуващ в природата плурипотентен гранулоцитен колония-стимулиращ фактор. Установено е, че ДНК последователностите на изобретението специфично включват : а) ДНК последователността, посочена на таблица 7 и таблица 8 или техните комплементарни вериги; б) ДНК последователност, която хибридизира (при условия на хибридизация, както са илюстрирани в настоящото или по-строги условия) към ДНК последователностите от таблица 7 или към техни фрагменти; и в) ДНК последователност, която поради разпадане на генетичния код би хибридизирала към ДНК последователността от таблица 7. Характерно, към точка б) се включват геномни ДНК последователности, кодиращи форми на алелни варианти на hpG-CSF и/или кодиращи плурипотентен гранулоцитен колония-стимулиращ фактор от други видове бозайници. Характерно, към точка в) се включват



произведени ДНК последователности, кодиращи hrG-CSF, фрагменти на hrG-CSF и аналози на hrG-CSF, чиито ДНК последователности могат да включват кодони, улесняващи транслацията на информационна РНК в микробиални гостоприемници. Такива произведени последователности лесно могат да се конструират съгласно методите на Alton, et al., РСТ публикувана заявка WO 83/04053.

В настоящото изобретение също се включват този клас полипептиди, кодирани от участъци на ДНК комплемент към top веригата на човешки сДНК или геномни ДНК последователности от таблица 7 или таблица 8 от настоящото, т.е. "комплементарни инвертирани протеини", както е описано от Tramontano, et al., *Nucleic Acids Res.*, 12,5049-5059 (1984).

Настоящото изобретение предоставя пречистени и изолирани полипептидни продукти, притежаващи част или цялата от първичната структурна конформация (т.е. непрекъснатата последователност на аминокиселинни остатъци) и едно или повече от биологичните свойства (например, имунологични свойства и *in vitro* биологична активност) и физични свойства (например молекулно тегло) на естествено съществуващи в природата hrG-CSF включително техни алелни варианти. Тези полипептиди също така се характеризират с това, че са продукт на химични процедури на синтез или на експресия в прокариотен или еукариотен гостоприемник (например от бактерии, дрожди, висши растения, насекоми и клетъчни култури от гръбначни) на екзогенни ДНК последователности, получени чрез геномно или сДНК клониране или чрез генен синтез. Продуктите на типични дрожди (например, *Saccharomyces cerevisiae*) или прокариотни

[*Escherichia coli* (*E. coli*)] клетки гостоприемници не са в асоциация с които и да са протеини от бозайници. Продуктите от микробиална експресия в клетки на гръбначни (например, бозайници не-хора и птици) не са асоциирани с които и да са човешки протеини. Според използвания гостоприемник полипептидите на изобретението могат да са гликолизирани с въглехидрати от бозайници и други еукариотни или могат да не са гликозирани. Полипептидите на изобретението също така могат да включват един първоначален метионинов аминокиселинен остатък (в позиция -1).

Изобретението включва също така фармацевтични състави, съдържащи ефективно количество полипептидни продукти от изобретението заедно с подходящ разреждател, помощни средства и/или носители полезни в hpG-CSF терапията.

Полипептидните продукти на изобретението могат да бъдат "белязани" чрез асоцииране с откриваеми маркерни вещества (например, белязан с изотопи с  $^{125}\text{I}$ ), за да се предоставят реагенти, полезни за откриване или количествено определяне на човешки hpG-CSF в твърди тъкани и течни проби като кръв или урина. ДНК продуктите на изобретението могат също да се бележат с откриваеми маркери (като радиомаркери и не-изотопни маркери като биотин) и да се използват при процесите на ДНК хибридизиране, за да се локализира позицията на гена на човешкия hpG-CSF и/или позицията на което и да е свързано генно семейство в хромозомната карта. Те могат също така да се използват за идентифициране на човешки hpG-CSF генни нарушения на

ДНК ниво и да се използват като генни маркери за идентифициране на съседните гени и тяхни нарушения.

Полипептидните продукти на настоящото изобретение могат да са полезни самостоятелно или в комбинация с други хематопоеични фактори или лекарствени средства при лечението на хематопоеични нарушения като апластична анемия. Те могат също така да са полезни за лечение на хематопоеичен дефицит, получен в следствие на хемотерапия или на радиационна терапия. Успехът на трансплантирането на костен мозък например може да се засили чрез прилагане на hpG-CSF. Оздравителният процес при лечение на рани от изгаряне и лечението на бактериално възпаление също може да се възползува от прилагането на hpG-CSF. Освен това hpG-CSF може също да е полезен при лечението на левкемия, основаваща се на съобщена способност за диференциране на левкемичните клетки. Welte, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82, 1526-1530 (1985) и Sachs, по-горе.

Многобройни аспекти и предимства на изобретението ще станат явни за специалистите в областта след разглеждане на следващото подробно описание, което предоставя илюстративен материал за практическото приложение на изобретението в предпочетани варианти за изпълнение на изобретението.

#### КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

Фигурата е частична рестрикционна ендонуклеазна карта на hpG-CSF гена, придружена от стрелки, обозначаващи

използуваната стратегия за секвениране за получаване на геномната последователност.

### ПОДРОБНО ОПИСАНИЕ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Съгласно настоящето изобретение са изолирани и охарактеризирани ДНК последователностите, кодиращи част или цялата полипептидна последователност на hrG-CSF.

Следващите примери са предоставени за илюстриране на изобретението и по-специално са насочени към процедурите, провеждани преди идентифицирането на сДНК на hrG-CSF и на геномните клонове, към процедури водещи до такова идентифициране и до секвенирането, развитието на експресионните системи, основаващи се на сДНК, геномни и произведени гени и проверката на експресията на hrG-CSF и аналогични продукти при такива системи.

По-специално пример 1 се отнася до секвениране на аминокиселинната последователност на hrG-CSF. Пример 2 се отнася до изготвянето на сДНК библиотека за скрининг за хибридизация на колонии. Пример 3 се отнася до конструирането на хибридизационни проби. Пример 4 се отнася до информация за хибридизационен скрининг, идентифициране на положителни клонове, ДНК секвениране на положителен сДНК клон и генериране на полипептидна първична структурна конформция (аминокиселинна последователност). Пример 5 се отнася до идентифициране и секвениране на геномен клон, кодиращ hrG-CSF. Пример 6 се отнася до конструирането на произведен ген, кодиращ hrG-CSF, при което се използват за предпочитане кодони на *E. coli*.

Пример 7 се отнася до процедури за конструиране на *E. coli* трансформационен вектор, включващ ДНК кодираща hrG-CSF, използването на вектора при прокариотна експресия на hrG-CSF, и до анализ на свойствата на рекомбинантните продукти на изобретението. Пример 8 се отнася до процедури за генериране на аналози на hrG-CSF, при което цистеинови остатъци се заместват от други подходящи аминокиселинни остатъци чрез средствата на мутагенеза, осъществен върху ДНК кодираща hrG-CSF. Пример 9 се отнася до процедури за конструиране на вектор, включващ hrG-CSF аналог-кодираща ДНК, произлизаща от положителен сДНК клон, използването на вектора за трансфектиране на COS-1 клетки, и култивирането на трансфектираните клетки. Пример 10 се отнася до физичните и биологични свойства или до рекомбинантните полипептидни продукти на изобретението.

#### ПРИМЕР 1

(A) Секвениране на материал, предоставен от методи в литературата

Проба (3-4  $\mu$ g, 85-90% чист SDS, оцветена със сребро PAGE) на hrG-CSF се получава от Sloan Kettering Institute, New York, N.Y., както е изолиран и пречистен съгласно Welte, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82, 1526-1530 (1985).

N-крайната аминокиселинна последователност на тази проба на hrG-CSF се определя в изпълнение # 1 чрез микро-секвенционен анализ при използване на AB407A газово-фазов секвенатор (Applied Biosystems, Foster City, Calif.) за доставяне на информация за последователности, посочена в Таблица 1 по-долу. В таблици 1 - 4 се използва еднобуквеният код, "X"

означава остатък, който не е определен недвусмислено и остатъците в скоби са определени само алтернативно или временно.

Таблица 1

1	5	10	15
K-P-L-G-P-A-S-K-L-K-Q - (G,V,S) -G-L-X-X-X			

При всеки цикъл на изпълнението присъства висок фон, за което резултатите са представени в таблица 1, означавайки, че резултатите от пробата имат много замърсяващи съставки, вероятно под формата на химични остатъци от пречистването. Последователността се запазва само за използване за сравнение.

При изпълнение # 2 втора проба (5-6 µg, ~ 95% чистота) се получава от Sloan Kettering, както в изпълнение # 1 и процедурата за секвениране се изпълнява както в изпълнение # 1. Тази проба се изпълнява от същата партида материал, използван за генериране на фигура 4 от Welte, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82, 1526-1530 (1985). Резултатите са посочени в таблица 2.

Таблица 2

1	5	10	15	20
(S) (L)				
T-P-L-G-P-A-S-(S)-L-P-Q- X - M - (M) -X-K-(R)-X-X-(R)-(L)-X				

Въпреки че са идентифицирани повече остатъци, изпълнение # 2 не доставя достатъчно дълга недвусмислена последователност, от която биха могли да се конструират

разумен брой проби за търсене на hpG-CSF ДНК. Бе пресметнато, че биха били необходими най-малко 1536 проби, за да се направи опит да се изолира сДНК на основата на последователността от таблица 2. Отново се предполага, че проблемът се състои в онечиствания в пробата.

В съответствие трета проба (3-5  $\mu\text{g}$ ,  $\sim 40\%$  чистота) се получава от Sloan Kettering, както по-горе. Този препарат се подлага на електроблотинг след разделяне чрез SDS-PAGE в опит за последващо пречистване. Секвенционният анализ на тази проба не дава никакви данни.

(В) Секвениране на материали, доставени от подобрени методи

С цел да се получи достатъчно количество чист МАТЕРИАЛ за осъществяване на подходящ окончателен анализ на аминокиселинната последователност, клетки от клетъчна линия от карцином на пикочния мехур 5637 (субклон 1A6) продуцирани от Sloan Kettering са получени от Dr. E. Platzer. Първоначално клетките се култивират в Iscove's среда (GIBCO, Grand Island, N.Y.) в колби до сливане. Когато се слоят, КУЛТУРИТЕ се обработват с трипсин и се посяват във ролерни бутилки (1½ колби/бутилка), всяка съдържаща 25 ml предварително кондиционирана Iscove's среда под 5% CO<sub>2</sub>. Клетките се култивират цяла нощ при 37°C, при 0,3 rpm (оборот в минута).

Cytodex-1 перли (Pharmacia, Uppsala, Sweden) се промиват и стерилизират при използване на следните процедури. Осем грама перли се поставят в бутилка и се прибавят 400 ml PBS. Перлите се суспендират като внимателно се върти в продължение на три часа. След като се

оставят перлите да се утаят, PBS се извежда, перлите се промиват в PBS и се прибавя свеж PBS. Перлите се автоклавират 15 минути. Преди използване перлите се промиват в Iscove's среда плюс 10% зародишен телешки серум (FCS) преди прибавяне на свежа среда плюс 10% FCS за получаване на обработени перли.

След отстраняване от всяка ролерна бутилка на всичко освен 30 ml от средата, към бутилките се прибавят 30 ml свежа среда плюс 10% FCS и 40 ml третирани перли. Бутилките се насищат с 5% CO<sub>2</sub> и всички мехурчета се отстраняват чрез изтегляне. Бутилките се поставят в ролерни рамки при 3 rpm в продължение на ½ час преди скоростта да се намали на 0,3 rpm. След три часа една допълнителна колба се обработва с трипсин и се добавя към всяка въртяща се бутилка, съдържаща перли.

При 40% до 50% сливане културите от ролерните бутилки се промиват с 50 ml PBS и се въртят 10 минути преди да се отстрани PBS. Клетките се култивират 48 часа в среда A [Iscove's среда съдържаща 0,2% FCS, 10<sup>-8</sup> M хидрокортизон, 2 mM глутамин, 100 единици/ml пеницилин и 100 µg/ml стрептомицин]. След това супернатантата на културата се събира чрез центрофугиране при 3000 rpm за 15 минути и се съхранява при -70°C. Културите се допълват със среда A, съдържаща 10% FCS, и се култивират 48 часа. След отстраняването на средата клетките се промиват с PBS както по-горе и се култивират 48 часа в среда A. Супернатантата отново се събира и се третира, както е описано по-горе.

Приблизително 30 литра среда, кондиционирана с 1A6 клетки, се концентрират до приблизително 2 литра върху



Millipore Pellicon единица, снабдена с 2 касети притежаващи 10000 M.W. прекъсване при скорост на филтриране от приблизително 200 ml/min и при скорост на задържане от приблизително 1000 ml/min. Концентратът се диафилтрира с приблизително 10 литра 50 mM Tris (pH 7,8) при използване на същия апарат и при същата скорост на потока. Диафилтрираният концентрат се зарежда на колона, уравновесена с 50 mM Tris (pH 7,8) с 1 литър DE целулоза при 40 ml/min. След зареждането колоната се промива при същата скорост с 1 литър 50 mM Tris (pH 7,8), а след това с 2 литра 50 mM Tris (pH 7,8) с 50 mM NaCl. След това колоната се елуира на порции с шест едно-литрови разтвора на 50 ml Tris (pH 7,5), съдържащи следните концентрации на NaCl : 75 mM; 100 mM; 125 mM; 150 mM; 200 mM; и 300 mM. Събират се фракции (50 ml), като активните фракции се обединяват и се концентрират до 65 ml върху Amicon ултрафилтрационна клетъчна единица с разбъркване, снабдена с YM5 мембрана. Този концентрат се зарежда върху 2-литрова AcA54 гел-филтрационна колона, уравновесена в PBS. Колоната се пуска при 80 ml/час и се събират 10-ml фракции. Активните фракции се обединяват и се зареждат директно върху C4 колона за Високо Ефективна Течна Хроматография (ВЕТХ).

Проби с обем в границите от 125 ml до 850 ml и съдържащи 1-8 mg протеин, приблизително 10% от който е hrG-CSF, се зареждат върху колоната при скорост на потока от 1 ml до 4 ml на минута. След зареждането и едно първоначално промиване с 0,1 M амониев ацетат (pH 6,0-7,0) в 80% 2-пропанол при скорост на потока от 1 ml/min. Едно-

милилитрови фракции се събират и се следят за протеини при 220 nm, 260 nm и 280 nm.

Като резултат от пречистването фракциите, съдържащи hpG-CSF, ясно се разделят (както фракции 72 и 73 от 80) от останалите фракции, съдържащи протеини. hpG-CSF се изолира (150 – 300 µg) с чистота от приблизително 85±5% и с добив от приблизително 50%. От този пречистен продукт 9 µg се използват при изпълнение # 4, един аминокиселинен анализ, при който протеиновата проба се полага върху активиран с TFA диск от фибростъкло без полибрен. Секвенционният анализ се провежда с АВ 470А секвенатор съгласно методите на Hewick, et al., J. Biol. Chem., 256, 7990-7997 (1981) and Lai, Anal. Chim. Acta, 163, 243-248 (1984). Резултатите от изпълнение #4 са изведени в таблица 3.

Таблица 3

1	5	10
Thr – Pro – Leu – Gly – Pro – Ala – Ser – Ser – Leu – Pro –		
	15	20
Gln – Ser – Phe – Leu – Leu – Lys – (Lys) – Leu – (Glu) – Glu –		
	25	30
Val – Arg – Lys – Ile – (Gln) – Gly – Val – Gly – Ala – Ala –		
Leu – X – X –		

При изпълнение #4 след 31-вия цикъл (съответстващ на остатък 31 в таблица 3) повече не се получава никаква

значима информация. С цел да се получи по-дълга недвусмислена последователност, при изпълнение #5, 14  $\mu\text{g}$  hpG-CSF, пречистен от кондиционираната среда, се редуцират с 10  $\mu\text{l}$   $\beta$ -меркаптоетанол в продължение на 1 час при 45°C, след което се изсушават под вакуум. Протеиновият остатък след това се рзтваря в 5% мравчена киселина преди да се приложи върху полибренирания диск от фибро-стъкло. Секвенционният анализ се провежда както при изпълнение #4 по-горе. Резултатите от изпълнение #5 са показани на таблица 4.

Таблица 4

1	5	10
Thr – Pro – Leu – Gly – Pro – Ala – Ser – Ser – Leu – Pro –		
	15	20
Gln – Ser – Phe – Leu – Leu – Lys – Cys – Leu – Glu – Gln –		
	25	30
Val – Arg – Lys – Ile – Gln – Gly – Asp – Gly – Ala – Ala –		
	35	40
Leu – Gln – Phe – Lys – Leu – Gly – Ala – Thr – Tyr – Lys –		
	45	
Val – Phe – Ser – Thr – (Arg) – (Phe) – (Met) – X		

Аминокиселинната последователност, посочена в таблица 4, е достатъчно дълга (44 остатъка) и недвусмислена,

за да се конструират проби за получаване на сДНК на hrG-CSF, както е описано по-горе.

## ПРИМЕР 2

Сред стандартните процедури за изолиране на сДНК последователности, представляващи интерес, е изготвянето на произлизаща от плазмид сДНК "библиотека", получена чрез обратна транскрипция на иРНК, изобилстваща в донорни клетки, подбрани въз основа на тяхната експресия на гена мишена. Когато значителни участъци от аминокиселинната последователност са известни белязани едноверижни последователности на ДНК проби, дублиращи последователност, за която се предполага, че присъства в сДНК "мишена", може да се използва в ДНК/ДНК процедури на хибридизация, осъществени върху клонирани копия на сДНК, които са били денатурирани до едноверижна форма. Weissman, et al., U.S.Pat. No. 4,394,443; Wallace, et al., *Nucleic Acids Res.*, 6, 3543-3557 (1979), и Reyes, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79, 3270-3274 (1982), и Jaye, et al., *Nucleic Acids Res.*, 11, 2325-2335 (1983). Виж също, U.S. Pat. No. 4,358,535 за Falkow, et al., във връзка с ДНК/ДНК процедури на хибридизация при поставянето на диагноза; и Davis, et al., "A Manual for Genetic Engineering, Advanced Bacterial Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1980) at pp. 55-58 I 174-176, отнасящо се до хибридизационни техники на колонии и плаки.

Общата РНК се екстрахира от приблизително един грам клетки от клетъчна линия 5637 (1A6) от карцином на пикочния мехур при използване на гуанидин тиоцианатната процедура

за количествено изолиране на интактна РНК. [Chirgwin, et al., *Biochemistry*, 18, 5294-5299 (1979)].

Стерилният воден разтвор на РНК, съдържа обща РНК от IA6 клетките. За получаване единствено на информационната РНК от разтвора на общата РНК, разтворът се пропуска през колона, съдържаща олигодезокситимидилрани [олиго(dT)] (Collaborative Research, Inc., Waltham, Mass. Poly-Adenylated (poly-A<sup>+</sup>) опашки, характерни за прилепването на информационната ДНК към колоната, докато рибозомалната РНК се елуира. В резултат на тази процедура се изолират приблизително 90 µg полиаденилирана информационна РНК (poly-A<sup>+</sup> иРНК). Изолираната poly-A<sup>+</sup> информационна РНК предварително се обработва с метилживачен хидроксид (Alpha Ventron, Danvers, Mass.) при крайна концентрация от 4 mM за 5 минути при стайна температура преди използване в сДНК реакция. Третирането с метилживачен хидроксид денатурира взаимодействието на информационната РНК, и с двете, както със себе си, така и със замърсяващите молекули, които инхибират транслацията. Payvar, et al., *J. Biol. Chem.*, 258, 7636-7642 (1979).

Съгласно Okayama procedure [Okayama, et al., *Molecular & Cellular Biology*, 2, 161-170 (1982)] се изготвя сДНК банка при използване на иРНК, получена от IA6 клетки. сДНК се трансформират след това чрез инкубиране в микроорганизъм гостоприемник *E. coli* K-12 щам HB101 за амплифициране.

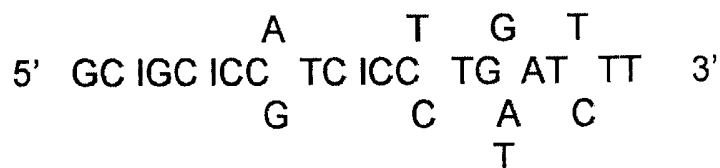
### ПРИМЕР 3

Хибридизационни проби, проектирани на основата на hrG-CSF аминокислотна последователност от таблица 4,

се състоят от комплект от 24 олигонуклеотида, всеки с дължина от 23 бази и съдържащ три инозинови остатъка. Олигонуклеотидите на пробите се произвеждат съгласно процедурата на Caruthers, et al., Genetic Engineering, 4, 1-18 (1982) и се бележат с  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$  АТР чрез обработване с полинуклеогидна киназа. Олигонуклеотидите на пробите съответстващи на информационната РНК за остатъци 23 - 30 от последователността от таблица 4 са илюстрирани в таблица 5.

Таблица 5

## hpG-CSF Проби



Определянето на неутралност към I's се основава на публикуваната работа на Takahashi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82,1931-1935 (1985) и Ohtsuka et al., J.Biol. Chem., 260, 2605-2608 (1985). Въпреки това инозинът може да има дестабилизиращо действие ако образува базова двойка с G или T. В Takahashi, et al., инозините могат да се явят като притежаващи неутрален ефект, тъй като се усредняват като група с близка неутралност (например три образуващи двойки благоприятни за C и две неблагоприятни за образуване на двойки с T).

За тестване на ефекта от притежаване на I's базова двойка с G's се проектират контролни експерименти при изоползване на N-мус гена последователност и клон. Последователностите, взети от N-мус гена, имат същото общо съдържание на G и C при първите две позиции на всеки кодон, както бе предписано от hpG-CSF пробите. Следователно N-мус тестовите проби са със същата дължина, съдържат I's в относително същата позиция и притежават потенциално същата средна Tm (62-66°C, без да се взимат предвид 3 или 4 инозинови остатъци, включително) както hpG-CSF пробите.

Два комплекта N-мус тестови проби се конструират съгласно процедурата на Caruthers et al., по-горе. Комплект 1, както е илюстриран в таблица 6, включва: 1. 23-мер с перфектно съвпадане; 2. в който три трети позиции C's са заместени с I's, като се генерира възможно най-лошият случай за прибавяне на I's; и 3. в който четири трети позиции C's са заместени с I's. Вторият комплект тестови проби се проектира да представлява по-случайно разпределение на инозиновите базови двойки, което трябва да даде един общ неутрален ефект на свързване на базовите двойки. Комплект 2, както е илюстрирано в таблица 6, включва: 4. съдържащ две I's който ще образува базова двойка с C's и една с G; и 5. идентичен на 4 с прибавяне на още една I : G базова двойка.

Таблица 6

N – мус тестови проби									
1.	5'	CAC	AAC	TAT	GCC	GCC	CCC	TCC	CC <sup>3'</sup>
2.	5'	CAC	AAC	TAT	GCI	GCC	CCI	TCI	CC <sup>3'</sup>
3.	5'	CAI	AAC	TAT	GCI	GCC	CCI	TCI	CC <sup>3'</sup>
4.	5'	AAC	GAG	CTG	TGI	GGC	AGI	CCI	GC <sup>3'</sup>
5.	5'	AAI	GAG	CTG	TGI	GGC	AGI	CCI	GC <sup>3'</sup>

Пет репликационни филтъра, съдържащи N – мус ДНК последователности и ДНК последователности от пилешки растежен хормон (като отрицателна контрола), се изпичат на вакуумна фурна в продължение на 2 часа при 80°C преди хибридизацията. Всички филтри се хибридизират, както е описано в пример 4 за hpG-CSF пробите, с изключение на това, че периодът на хибридизация е само 6 часа. Филтрите се промиват три пъти на стайна температура, след това веднъж при 45°C за 10 минути всеки. Филтрите се следят с Гайгеров брояч.

Филтърът, представляващ N-мус проба 3, дава много тих сигнал по отношение на останалите 4 филтъра с проби и повече не се промива. След 10 минути промиване на 50°C, Гайгеровият брояч дава следния процентен сигнал, като проба 1 се нормализира до 100% ; проба 2 , 20%; проба 3 (45°C), 2%; проба 4, 92%; и проба 5, 75%. След промиване при 55°C



процентите стават : проба 2, 16%; проба 4, 100%; и проба 5, 80%. Крайно промиване при 60°C дава следните проценти : проба 2 , 1,6%; проба 4, 90%; и проба 5, 70%.

Следователно, в присъствието на 3 I's, както в проби 2 и 4 се наблюдава до 60 пъти разлика в сигнала спрямо теоретичната  $T_m$  (I's не се включва в сметките), се доближава [на основата на най-лошия случай I на образуване на базови двойки (проба 2) и относително неутрален I случай на образуване на базови двойки (проба 4)].

Получената стандартизирана информация чрез N-тест хибридизации се използва при промиването и онагледяването на hpG-CSF хибридизацията, както е посочено по-долу за проверка на степента на доверие, с която резултатите под строгото промиване трябва да бъдат приети.

#### ПРИМЕР 4

Съгласно процедурата на Hanahan, et al., J.Mol. Biol., 166, 557-580 (1983) бактерии, съдържащи рекомбинанти със сДНК инсерти, както са получени в пример 2, се разпръскват върху 24 нитроцелулозни филтри (Millipore, Bedford, Mass.), положени върху агарови блюда. След това блюдата се инкубират до установяване на приблизително 150000 колонии, които репликативно се посяват на други 24 нитроцелулозни филтъра. Репликите се инкубират до появата на отделни колонии. Бактериите върху филтрите се лизират върху листове Watman 3 MM хартия слабо наситена с натриев хидроксид (0,5 M) за 10 минути, след което се накапват с Tris (1 M) за 2 минути, следван от накапване с Tris (0,5 M) съдържащ NaCl (1,5 M) за 10 минути. Когато филтрите са

почти изсушени, те се изпичат в продължение на 2 часа при 80°C във вакуумна фурна преди хибридизацията на нуклеиновата киселина. [Wahl, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76, 3683-3687 (1979)]; и Maniatis, et al., Cell, 81, 163-182 (1976).

Филтрите предварително се хибридизират 2 часа при 65°C във 750 ml 10x Denhardt's, 0,2% SDS и 6x SSC. Филтрите се промиват в 6xSSC, след което четири се поставят в торбичка и се хибридизират 14 часа в 6xSSC и 10x Denhardt's. Има приблизително по 15 ml разтвор на торбичка, съдържаща  $50 \times 10^6$  cpm проби (олигонуклеотиди), белязани с  $^{32}\text{P}$ .

След хибридизирането филтрите се промиват три пъти в 6xSSC (1 литър/промиване) при стайна температура за 10 минути всеки. След това филтрите се промиват два пъти при 45°C за 15 минути всеки, веднъж при 50°C за 15 минути и веднъж при 55°C за 15 минути при използване на 1-литрови обеми от 6xSSC. Филтрите се автордиографират 2 часа при -70°C при използване на усилващ екран и Kodak XAR-2 филм. На този автордиограф има 40-50 открити позитивни сигнала, включително 5 много силни сигнала. Полетата, включващи петте най-силни сигнала и допълнителни пет позитивни, се остъргват от главните блюда и отново се посяват за вторично скриниране при използване на същата смес за проби при същите условия. Процедурата по промиването се различава по това, че промиванията при висока температура се състоят от две при 55°C за 15 минути всяко, след което едно при 60°C за 15 минути. На базата на изследването на N-тус проба от пример 3 последната температура на промиване при второто скриниране се повишава, тъй като температурата на топене на

агрегата на 24-те 23-мери е 60-68°C, подобна на тази на N-тус пробите. Едва след второто промиване на 55°C филтрите се овлажняват и се прави автордиография. Сравняването на тази автордиография с втората автордиография, проведена за подобен период от време след последното промиване при 60°C показва, че само 10 клона от тестваните не страдат от значителна загуба на сигнал при повишаване от 55-60°C. За тези два клона по-късно бе доказано, че са с почти идентична дължина и модели на рестрикционна ендонуклеаза. За скрининга се подбира един клон, назован Ppo2.

Секвенирането на рекомбинантния cДНК клон на hrG-CSF, Ppo2, получен по горните процедури, се извършва чрез дидезокси метода на Sanger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 74, 5463-5467 (1977). Едноверижният ДНК-ов фаг M-13 се използва като вектор за клониране за доставяне на едноверижни ДНК матрици от двуверижни cДНК клонове. Методът на Sanger, et al., извежда последователността, както е показана на таблица 7, придружена от нейната аминокиселинна транслация и комплементарна верига в кодиращата област на полипептида.



(Продължение)

50

Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro  
GAG CTG GTG CTG CTC GGA CAC TCT CTG GGC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC AGC TGC CCC  
CTC GAC CAC GAC GAG CCT GTG AGA GAC CCG TAG GGG ACC CGA GGG GAC TCG TCG ACG GGG

60

70

Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr  
AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC TGC TTG AGC CAA CTC CAT AGC GGC CTT TTC CTC TAC  
TCG GTC CCG GAC GTC GAC CGT CCG ACG AAC TCG GTT GAG GTA TCG CCG GAA AAG GAG ATG

80

90

Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr  
CAG GGG CTC CTG CAG GCC CTG GAA GGG ATC TCC CCC GAG TTG GGT CCC ACC TTG GAC ACA  
GTC CCC GAG GAC GTC CCG GAC CTT CCC TAG AGG GGG CTC AAC CCA GGG TGG AAC CTG TGT

100

(Продължение)

110

Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Glu  
CTG CAG CTG GAC GTC CCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GAA  
GAC GTC GAC CTG CAG CCG CTG AAA CCG TGG TAG ACC GTC GTG TAC CTT CTT GAC CCT

120

130

Met Ala Pro Ala Leu Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln  
ATG GCC CCT GCC CTG CAG CCC ACC CAG GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG  
TAC CCG GGA CCG GAC GTC GGG TGG CTC CCA CCG TAC GGC CCG AAG CCG AGA CGA AAG GTC

140

150

Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr  
CGC CCG GCA GGA GGG GTC CTG GTT GCC TCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC  
GCG GCC CGT CCT CCC CAG GAC CAA CCG AGG GTA GAC GTC TCG AAG GAC CTC CAC AGC ATG

160

---

(Продължение)

170

Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro OP

CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCC CAG CCC TGA GCC AAG CCC TCC CCA TCC CAT GTA TTT ATC  
CGC CAA GAT GCG GTG GAA CCG GTC GGG ACT

174

TCT ATT TAA TAT TTA TGT CTA TTT AAG CCT CAT ATT TAA AGA CAG GGA AGA GCA GAA CCG

AGC CCC AGG CCT CTG TGT CCT TCC CTG CAT TTC TGA GTT TCA TTC TCC TGC CTG TAG CAG

StuI

TGA GAA AAA GCT CCT GTC CTC CCA TCC CCT GGA CTG GGA GGT AGA TAG GTA AAT ACC AGG

TAT TTA TTA CTA TGA CTG CTC CCC AGC CCT GGC TCT GCA ATG GGC ACT GGG ATG AGC GGC

TGT GAG CCC CTG GTC CTG AGG GTC CCC ACC TGG GAC CCT TGA GAG TAT CAG GTC TCC CAC

---

---

(Продължение)

GTG GGA GAC AAG AAA TCC CTG TTT AAT ATT TAA ACA GCA GTG TTC CCC ATC TGG GTC CTT  
GCA CCC CTC ACT CTG GCC TCA GCC GAC TGC ACA GCG GCC CCT GCA TCC CCT TGG CTG TGA  
GGC CCC TGG ACA AGC AGA GGT GGC CAG AGC TGG GAG GCA TGG CCC TGG GGT CCC ACG AAA  
TTG CTG GGG AAT CTC GTT TTT CTT CTT AAG ACT TTT GGG ACA TGG TTT GAC TCC CGA ACA  
TCA CCG ACG TGT CTC CTG TTT TTC TGG GTG GCC TCG GGA CAC CTG CCC TGC CCC CAC GGG  
GGT CAG GAC TGT GAC TCT TTT TAG GGC CAG GCA GGT GCC TGG ACA TTT GCC TTG CTG GAC  
GGG GAC TGG GGA TGT GGG AGG GAG CAG ACA GGA GGA ATC ATG TCA GGC CTG TGT GTG AAA

StuI

---



---

(Продължение)

GGA AGC TCC ACT GTC ACC CTC CAC CTC TTC ACC CCC CAC TCA CCA GTG TCC CCT CCA CTG

TCA CAT TGT AAC TGA ACT TCA GGA TAA TAA AGT GTT TGC CTC CA

[ 130 – 200 бази poly A плюс 25 – 30 бази плазмидна ДНК предшествана от PvuII рестрикционен сайт ] – 3'

---

Следните характеристики на последователността от таблица 7 са за отбелязване. При 5' края на последователността са показани бази, съответстващи на тези от поли G сДНК линкер. Тогава там се появяват около пет бази (означени с "N"), чиято последователност не може направо да се определи недвусмислено по метода на Sanger et. al., поради предшестващите многобройни G's. По – нататък последователността показва серия от 12 кодона, кодиращи част от предполагаема лидерна последователност за полипептида. На основата на съответствие на аминотерминалната последователност на естествени изолати от hpCSF, описани в пример 1 инициращия треонинов остатък на предполагаемата "зряла" форма hpG-CSF, се отбелязва чрез +1. След това бе показано за зрелия hpG-CSF, че включва 174 остатъка, както е посочено. След "стоп" кодона (OP кодона, TGA) има приблизително 856 бази от една нетранслирана 3' последователност и многобройни A's от poly A "опашка". Уникалните HgiA<sub>i</sub> и ApaI рестрикционни ендонуклеазни сайтове за разпознаване, както и два StuI сайтове (обсъждани по-долу, с оглед конструирането на прокариотни и еукариотни експресионни системи) също са посочени в таблица 7. Поради липсата на аспергинови остатъци в полипептида няма явни сайтове за N-гликозилиране. Подчертаните 6 бази близо до края на 3' нетранслираната последователност представляват потенциален сайт за полиаденилиране.

За отбелязване е, че всеки от два допълнителни сДНК клона, идентифицирани чрез процедурите на хибридизация, описани по-горе, от общо 450 000 клона не успяват да включат

ДНК, кодираща цялата лидерна последователност от сайта за инициране на транскрипцията напред. Всъщност всичките три hrG-CSF клона, завършващи в 5' областта точно при същия сайт, посочва, че вторичната структура на иРНК строго транскрибира задните сДНК образувания отвъд този сайт. Следователно, от практическа гледна точка скринингът на сДНК експресията, както е описан от Okayama et al., *Mol. and Cell. Biol.*, 3, 280-289 (1983) и използван всъщност за изолиране на GM-CSF във Wong, et al., *Science*, 228, 810-814 (1985) не може направо да се приложи за изолиране на hrCSF ДНК, тъй като такива системи за изолиране обикновено се базират на присъствието на сДНК транскрипт в пълна дължина в изследваните клонове.

Горната последователност не е точно чувствителна на подsigуряване на директна експресия на hrG-CSF в микробиален гостоприемник. За подsigуряване на такава експресия, кодиращата област на hrG-CSF трябва да бъде снабдена с ATG кодон за инициране и последователността трябва да бъде инсерирана във вектор за трансформиране в сайт под контрола на подходяща промоторна/регулаторна ДНК последователност.

#### ПРИМЕР 5

В този пример сДНК кодираща hrG-CSF, както е изолирана в предходния пример, се използва за скриниране на геномен клон. Геномна библиотека на ламбда фага на човешки зародишен черен дроб [изготвена съгласно процедурата на Lawn, et al., *Cell*, 15, 1157-1174 (1978) и получен от T. Maniatis] се скринира при използване на pick-

транслирана проба, състояща се от два hpG-CSF cДНК фрагмента, изолирана чрез смилане с HgiAI и StuI (HgiAI до StuI, 649 bp; StuI до StuI, 639 bp). Общо около 500 000 фага се посяват върху 12 (15 cm) петриеве блюда и плаките се отделят и хибридизират с пробата при използване на процедурата на Benton/Davison [Benton et al., Science, 196, 180 (1977)]. Наблюдават се общо 12 позитивни клона. Три клона (1-3), даващи най-силните сигнали при авторадиография при второ скриниране, се култивират в 1-о литрови култури и се картират чрез смилане с рестрикционен ензим и Southern blotting при използване на белязан с изотоп 24-мерен олигонуклеотид (обработен с киназа с  $\gamma$ -<sup>32</sup>P АТФ) 5'CTGCACTGTCCAGAGTGCACTGTG3'. Резултатите от картирането показват, че изолати 1 и 3 са идентични, а 2 съдържа 2000 допълнителни бази 5' към hpG-CSF гена. Поради това клон 2 се използва за последващо охарактеризиране. ДНК от клон 2 се смилва с R1 за освобождаване на фрагмент от 850 bp, съдържащ hpG-CSF, който след това се субклонира в pBR322 с последващо картиране чрез смилане с рестрикционни ендонуклеази, Southern blotting, M13 субклониране и секвениране. Получената последователност е посочената на таблица 8.

Таблица 8

GGGGACAGGCTTGAGAAATCCCAAGGAGAGGGGCAAGGACACTGCCCCCC  
GCAAGTCTGCCAGAGCAGAGAGGGAGACCCCGACTCAGCTGCCACTTCCC 100

CACAGGCTCGTGCCGCTTCCAGGCGTCTATCAGCGGCTCAGCCCTTTGTTCC  
AGCTGTTCTGTTCAAACACTCTGGGCCATTTCAGGCCCTGGGTGGGCAGC 200

GGGAGGAAGGAGTTTGAGGGGGCAAGGCGACGTCAAAGGAGGATCAGA  
GATTCCACAATTTCACAAAACCTTTCGCAACACAGCTTTTGTCCAACCCC 300

CCTGCATTGCTTGGACACCAAATTTGCATAAATCCTGGGAAGTTATTAC  
TAAGCCTTAGTCGTGGCCCCCAGGTAATTTCCCTCCCAGGCCCTCCATGGGGT 400

TATGTATAAGGGCCCCCTAGAGCTGGGCCCCAAACAGCCCCGGAGCCTG

-30

Met Ala Gly Pro Ala Thr Gln Ser Pro M

CAGCCCAGCCCCACCCAGACCCCATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCA 500

(Продължение)

-20 -18  
 et Lys Leu Met A  
 TGAAGCTGATGGGTGAGGTGTCTTGGCCCAGGATGGGAGAGCCGCCTGCCCC  
 TGGCATGGGAGGAGGCTGGTGTGACAGAGGGGCTGGGGATCCCCGTTCT 600

GGGAATGGGGATTAAAGGCACCCAGTGTCCCCGAGAGGGCCCTCAGGTGGT  
 -16  
 la Leu Gln Leu L

AGGGAACAGCATGTCTCCTGAGCCCAGGCTGTGTCGCCAGCCCTGCAGCTGC 700

-10 -1  
 eu Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala  
 TGCTGTGGCACAGTGCACACTCTGGACAGTGCAGGAAGCC

+1 10  
 Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu Pro  
 ACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCC

(Продължение)

20

Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Va  
CAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGT 800

30

35

I Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu  
GAGGAAGATCCAGGGCGGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTG  
GTGAGTGAGGTGGTGAGAGGGCTGTGGAGGGGAAGCCCGGTGGGAGAGCTAAGGGG 900

GATGGAACCTGCAGGGCCCAACATCCTCTGGAAGGGACATGGGAGAATATTA  
GGAGCAGTGGAGCTGGGGAAGGCTTTTAAAGGACTTGGGGAGGACCT 1000

TGGTGGGACAGTGCTCGGGAGGGCTGGCTGGGATGGGAGTGGAGGCATC  
ACATTCAGGAGAAAGGGCAAGGGCCCTGTGAGATCAGAGAGTGGGGGTG 1100

CAGGGCAGAGGAACTGAACAGCCTGGCAGGACATGGAGGGAGGGAAA  
GACCAGAGAGTCGGGGAGGACCCGGGAAGGAGCGGCCACCCGCGGC 1200

(Продължение)

GAGTCTCACTCAGCATCCTTCCATCCCCAG

36

40

50

Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Leu Val Leu Leu  
 TGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGTGCTC

Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp A  
 GGACACTCTCTGGGCATCCCCCTGGG 1300

60

70 71

Ia Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu  
 CTCCCCTGAGCAGCTHCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGTGTGTCAGG  
 AAAGGATAAGGCTAATGAGGAGGGGGAAGGAGGAGGAAACCCCATGGG 1400

CTCCCCCATGTCTCCAGGTTCCAAGCTGGGGCCTGACGATATCTCAGGCA

72

Ala Gly Cys Leu Ser Gln  
 GCACCCCTAACTCTTCCGCTCTGTCTCACAGGCAGGCTGCTTGAGCCAA 1500



(Продължение)

80

Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln  
CTCCATAGCGGCCYYTTCCTCTACCAGGGGCUCCCTGCAG

90

100

Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly  
GCCCTGGAAGGGGATCTCCCCCGAGTTGGGT

110

Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val A  
CCAACCTTGGACACACAATGCAGCTGGACGTCG 1600

120

la Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln  
CCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGGTGAGCCCTTGTGGGCAGGGT  
GGCCAAGGTGCTGCTGGCATTCTGGGCACCACAGCCGGCCTGTGTATGG 1700

GCCCTGTCCATGCTGCAGCCCCCAGCATTTCCTCATTTGTAATAAGCC

(Продължение)

121  
 Met Glu G  
 CACTCAGAAGGGCCCAACCACTGATCACAGCTTTCCCCACAGATGGAAG 1800

130  
 lu Leu Gly Met Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe  
 AACTGGGATGGCCCTGCAGCCCAACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTC

140  
 Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser Hi  
 GCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGCCAGGAGGGTCCCTGGTTGCCCTCCCA 1900

150  
 s Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His  
 TCTGCAGAGCTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCAC

160  
 Leu Ala Gln Pro OP  
 CTGCCCAGCCCTGAGCCAAGCCCTCCCAATCCCATGTAATTTATCTCTATTATAT 2000

170  
 174

---

(Продължение)

TTATGTCTATTTAAGCCTCATATTTAAGACAGGGAAGACAGACGGAG  
CCCCAGGCCTCTGTGTCCCTTCCCTGCATTTCTGAGTTTCATTCCTCGCC 2100

TGTAGCAGTGAGAAAAGCTCCTGTCCCTCCCATCCCTGGACTGGGAGGT  
AGATAGGTAATAACCAAGTATTTAATACTATGACTGCTCCCCAGCCCTGG 2200

CTCTGCAATGGGCACTGGGATGAGCCGCTGTGAGCCCCCTGGTCCTGSGGG  
TCCCCACCTGGGACCCCTTGAGAGTATCAGGTCTCCCCACGTGGGAGACAAG 2300

AAATCCCTGTTTAAATATTTAACAGCAGTGTTCCCCATCTGGGTCCCTTGC  
ACCCCTCACTCTGGCCTCAGCCGACTGCACAGCGGCCCTGCATCCCCCTT 2400

GGCTGTGAGGCCCCCTGGACAAGCAGAGGTGGCCAGAGCTGGGAHHCATGG  
CCCTGGGGTCCCACGAAATTTGCTGGGGAATCTCGTTTTTCTTAAAGAC 2500

TTTTGGACATGGTTTACTCCCGAACATCACCGACGTGTCTCCTGTTTT  
TCTGGGTGCCCTCGGGACACCTGCCCTGCCCCACGAGGGTCAGGACTGT 2600

---

---

(Продължение)

GACTCTTTT TAGGCCAGGCGCTGGACATTTGCCCTTGCTGGATGG  
GGACTGGGGATGTGGGAGGGAGCAGACAGGAGGAATCATGTCAGGCCTGT 2700

GTGTGAAAGGAGCTCCACTGTCACCCCTCCACCTCTTCACCCCCCACTCA  
CCAGTGTCCTCCACTGTCACATTTGTAACCTGAACTTCAGGATAATAAAG 2800

TGTTTGCCTCCAGTCACGTCCTCCCTCTTGAGTCCAGCTGGTGCCCT  
GGCCAGGGGCTGGGGAGGTGGCTGAATTTGGGAGAGGCCAGGGGAGGT 2900

CGGGAGGAGGTCTGGGGAGGAGGTCCAGGGAGGAGGAAAGTTCTCA  
AGTTCGTCTGACATTCATCCGTTAGCACATAATTTATCTGAGCACCTACT 3000

CTGTGCAGACGCTGGGCTAAGTGCTGGGGACACAGCAGGGAACAAGGCAG  
ACATGGAATCTGCACTCGAG 3070

---

Подробно е показана на фигура 1 рестрикционна ендонуклеазна карта (приблизително 3,4 Kb) на геномна ДНК, съдържаща *hrG-CSF* гена. Рестрикционните ендонуклеази, показани на фигура 1, са: *NcoI*, *N*; *PstI*, *P*; *BanHI*, *B*; *ApaI*, *A*; *XhoI*, *X*; и *KpnI*, *K*. Стрелките под картата показват стратегията на секвениране, използвана за получаване на геномна последователност. Областите, оградени в правоъгълници, са откритите в сДНК клона, като правоъгълниците с пунктир представляват последователност, присъстваща в сДНК клона, но идентифицирана чрез изследване на иРНК петна. Идентифицирането на кодиращи последователности, предложени за екзон 1, се провежда чрез Northern blot анализ.

24-мерна олигонуклеотидна проба

5'СAGCAGCTGCAGGGCCATCAGCTT3', заемаща предсказаните места на свързване за екзони 1 и 2 се хибридизира с *hrG-CSF* и РНК в Northern blot формат. Полученото петно показва иРНК със същият размер (~1650 bp) като установената с екзон 2 олигонуклеотидна проба. Тези данни, комбинирани със способността на *pSVGМ-ProI* вектора да провежда експресията на *hrG-CSF* (пример 9) при използване на Met кодон за инициране, посочен на таблица 8, дефинира кодиращите последователности, включени в екзон 1. Екзони 2–5 се дефинират чрез кодиращите последователности, получени в сДНК клона (*Pro2*) на *hrG-CSF* гена (таблица 7).

#### ПРИМЕР 6

Този пример се отнася до приготвянето на произведен ген, кодиращ *hrG-CSF* и включващ предпочитани кодони на *E. coli*.

Накратко, използваният протокол най-общо е като описаният в PCT публикация No WO83/04053 в съпритежание на Alton, et al., който е включен в настоящото за справка. Гените се проектират за първоначално събиране на съставните олигонуклеотиди в многобройни дуплекси, които на свой ред се събират в три отделни секции. Тези секции се проектират за бързо амплифициране и, след отстраняване от системата за амплифициране, могат да се сглобят по секвенции или чрез многобройно лигиране на фрагменти в подходящ експресионен вектор.

Конструирането на секции I, II и III е илюстрирано в таблици 9 до 14. При конструирането на секция I, както е илюстрирано в таблица 9 и 10, олигонуклеотиди 1-14 се сглобяват в 7 дуплекса (1 и 8; 2 и 9; 3 и 10; 4 и 11; 5 и 12; 6 и 13; и 7 и 14). Седемте дуплекса след това се лигират, за да образуват секция I, както е показано на таблица 10. Може да се отбележи също на таблица 10, че секция I включва в посока upstream един XbaI леплив край, а в посока downstream BamHI леплив край, използвани за лигиране към амплификационни и експресионни вектори и за лигиране към секция II.

Таблица 9

EchpG-CSFDNA – СЕКЦИЯ I	
CTAGAAAAACCAAGGAGGTAATAA	1
TAATGACTCCATTAGGTCCTGCTTCTTCT	2
CTGCCGCAAAGCTTTCTGCTGCTGAAATGTCTGG	3

---

(продължение)

AACAGGTTTCGTAAAATCCAGGGTGACGGT	4
GCTGCACTGCAAGAAAACTGTGCGCTA	5
CTTACAAACTGTGCCATCCGGAAGAGC	6
TGGTACTGCTGGGTCATTCTCTTGG	7
CATTATTTATTACCTCCTTGGTTTTTT	8
GCAGAGAAGAAGCAGGACCTAATGGAGT	9
TGTTCCAGACATTTTCAGCAGAAAGCTTTGCG	10
CAGCACCGTCACCCTGGATTTTACGAACC	11
TAAGTAGCGCACAGTTTTTCTTGCAAGT	12
ACCAGCTCTTCCGGATGGCACAGTTTG	13
GATCCCAAGAGAATGACCCAGAAGT	14

---

ТАБЛИЦА 10

		EchpG-CSF ДНК СЕКЦИЯ I					
10	СТАГААААА TTTTT	<u>1</u> ACCAAGGAGG TGGTCCCTCC	30 ТААТАААТАА АТТАТТАТТ	40 ТГАСТССАТТ АСТГАГГТАА	<u>2</u> AGGTCCCTGCT TCCAGGACCGA	50 ТСТТСТСТГС АГААГАГАССГ	60
	XbaI	<u>8</u>					
70	CGCAAAGCTT GCGTTTCGAA	<u>3</u> TCTGCTGAAA AGACGACTTT	90 TGTC TGGAAC ACAGACCTTG	100 AGGTTCGТАА TCCAAГСАТТ	4 AATCCAGGGT TTAGGTCCCA	110 GACGGTGCTG CTGCCACCGAC	120
		<u>10</u>					
130	CACTGCAAGA GTGACGTTCT	<u>5</u> AAAAC TGTC TTTTGACACG	150 GCTACTTACA CGATGAAATGT	160 AACTGTGCCA TTGACACCGGT	<u>6</u> TCCGGAAGAG AGGCCTTCTG	170 СТGGTACTGC GACCAATGACG	180
		<u>12</u>					
7	190 TGGGTCATTC ACCCAGTAAG	200 TCTTGG AGAACCCTAG					
		<u>14</u>					
		BamHI					



Както е показано на таблица 11 и 12 при конструирането на секция II, олигонуклеотиди 15-30 се сглобяват в осем дуплекса (15 и 23; 16 и 24; 17 и 25; 18 и 26; 19 и 27; 20 и 28; 21 и 29 и 22 и 30). Тези осем дуплекса след това се лигират, за да образуват секция II, както е показано на таблица 12. Както е показано след това на таблица 12, секция II включва в посока upstream един BamHI леплив край и в посока downstream EcoRI леплив край; използвани за лигиране към амплификационен вектор и за лигиране към секция I. Близо до нейния downstream край секция II включва също така downstream SstI сайт, използван при евентуално лигиране на секция II и III.

Таблица 11

## EchpG-CSFDNA – СЕКЦИЯ II

GATCCCGTGGGCTCCGCTGTCTTCT	15
TGTCCATCTCAAGCTCTTCAGCTGGC	16
TGGTTGTCTGTCTCAACTGCATTCTGGT	17
CTGTTCCCTGTATATCAGGGTCTTCTG	18
CAAGCTCTGGAAGGTATCTCTCCGGA	19
ACTGGGTCCGACTCTGGACACTCTGCA	20
GCTAGATGTAGCTGACTTTGCTACTACT	21

---

(продължение)

ATTTGGCAACAGATGGAAGAGCTCAAAG	22
GACAAGAAGACAGCGGAGCCCACGG	23
ACCAGCCAGCTGAAGAGCTTGAGATG	24
ACAGACCAGAATGCAGTTGAGACAGACA	25
CTTGCAGAAGACCCTGATACAGGA	26
CAGTTCCGGAGAGATACCTTCCAGAG	27
TAGCTGCAGAGTGTCCAGAGTCGGACC	28
AAATAGTAGTAGCAAAGTCAGCTACATC	29
AATTCTTTGAGCTCTTCCATCTGTTGCC	30

---



Последно, секция III се конструира, както е показано на таблици 13 и 14. За тази конструкция олигонуклеотиди 31-42 се сглобяват в 6 дуплекса (31 и 37; 32 и 38; 33 и 39; 34 и 40; 35 и 41; и 36 и 42). Шестте дуплекса след това се лигират за да образуват секция III, както е показано на таблица 14. Както е показано след това на таблица 14, секция III включва в посока upstream един BamHI леплив край, а в посока downstream EcoRI леплив край, използвани за лигиране към амплификационен вектор, и поне в случая на EcoRI края, в експресионен вектор. В допълнение секция II има в посока upstream SstI сайт, използван при евентуално лигиране на секция II и III.

Таблица 13

EchpG-CSFDNA СЕКЦИЯ III	
GATCCAAAGAGCTCGGTATGGCACCCAG	31
CTCTGCAACCGACTCAAGGTGCTATGCCG	32
GCATTCGCTTCTGCATTCCAGCGTCGTGC	33
AGGAGGTGTA CTGGTTGCTTCTCATCTG	34
CAATCTTTCCCTGGAAGTATCTTACCGTGT	35
TCTGCGTCATCTGGCTCAGCCGTAATAG	36
AGAGCTGGTGCCATACCGAGCTCTTTG	37

(Продължение)


---

ATGCCGGCATAGCACCTTGAGTCGGTTGC	38
TCCTGCACGACGCTGGAATGCAGAAGCGA	39
ATTGCAGATGAGAAGCAACCAGTACACC	40
CAGAACACGGTAAGATACTTCCAGGAAAG	41
AATTCTATTACGGCTGAGCCAGATGACG	42

---

XbaI към BamHI фрагмент, образуван в секция I, се лигира в M13mpII фагов вектор, отворен с XbaI и BamHI. След това векторът отново се отваря чрез смилане BamHI и EcoRI, следвано от лигиране с BamHI към EcoRI фрагмент, образуван чрез секция II. На този етап секции I и II са свързани в правилна ориентация. След това друг M13mpII вектор се отваря чрез BamHI до EcoRI смилане, след което се лигира с BamHI към EcoRI фрагмента, образуван чрез секция III.

Векторът, съдържащ секции I и II, се смилва с XbaI и SstI. Подобно, векторът, съдържащ секция III, се смилва със SstI и EcoRI. И двата по-малки от двата фрагмента, получени от всяко смилане, се лигират в плазмид pCFM1156, който предварително е отворен с XbaI и EcoRI. Продуктът на тази реакция е експресионен плазмид, съдържащ непрекъснатата ДНК последователност, както е показано на таблица 15, кодиращ целия hpG-CSF полипептид с аминокислотен метионинов кодон (ATG) за инициране на транслацията в E. coli.

ТАБЛИЦА 14

		EChpG-CSF ДНК СЕКЦИЯ III			
10	GATCCAAAG GTTC	31 20 AGCTCGGTAT TCGAGCCATA <u>37</u>	30 GGCACCAGCT CCGTGGTCGA	40 CTGCAACCGA GACGTTGGCT	50 60 CTCAAGGTGC GAGTTCACG <u>38</u> ТАТGCCCГGCA АТАCGGCCGT
	<u>Bam</u> HI	<u>Sst</u> I			
70	TTCCGTTCTG AAGCGAAGAC	33 80 CATTCACCG GTAAAGGTCGC <u>39</u>	90 TCGTGCAGGA AGCACGTCCTT	100 GGTGTACTGG CCACA'GACC	120 TCTGCAATCT AGACGTTAGA
35 130	TTCCCTGGAAG AAGGACCTTC <u>41</u>	140 TATCTTACCG ATAGAATGGC	150 TGTTCTGCCGT ACAAGACCGCA	36 160 CATCTGGCTC GTAGACCCGAG	170 AGCCGTAATA TCGGCAATTAT <u>42</u> G CTTAA <u>Eco</u> RI

Въпреки че може да се използва който и да е подходящ вектор за експресиране на тази ДНК, експресионният плазмид pCFM1156 лесно може да се конструира от плазмид pCFM836, чиято конструкция е описана в публикувана заявка за Европейски Патент No 136,490. pCFM836 първо се срязва с NdeI а после се прави с тъпи краища с PstI, като по този начин се разрушават двата съществуващи NdeI сайта. След това векторът се смилва с ClaI и SacII за отстраняване на съществуващия полилинкер преди лигирането към заместващ полилинкер, както е показано на таблица 16. Този заместващ полилинкер може да се конструира съгласно процедурата на Alton, et al., по-горе. Контролът на експресията в експресионния pCFM1156 плазмид се осъществява посредством ламбда P<sub>L</sub> промотор, който от своя страна може да бъде под контрола на C<sub>1857</sub> репресорен ген (каквото е доставен в E. coli щам K12ΔHtrp).

#### ПРИМЕР 7

Този пример се отнася до експресия на hpG-CSF полипептид в E. coli посредством ДНК последователност, кодираща [Met<sup>-1</sup>] hpCSF. Използваната последователност частично е синтетична и частично произлиза от cДНК. Синтетичната последователност използва предпочитаните кодони за E. coli.

Таблица 15

	-1	+1	
			Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu
			C TAG AAA AAA CCA AGG AGG TAA TAA ATA ATG ACT CCA TTA GGT CCT GCT TCT TCT CTG
10		20	
			CCG CAA AGC TTT CTG CTG AAA TGT CTG GAA CAG CTT CGT AAA ATC CAG GGT GAC GGT GCT
			Pro Gln ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala
30		40	
			Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu
			GCA CTG CAA GAA AAA CTG TGC GCT ACT TAC AAA CTG TGC CAT CCG GAA GAG CTG GTA CTG
50		60	
			Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu
			CTG GGT CAT TCT CTT GGG ATC CCG TGG GCT CCG CTG TCT TCT TGT CCA TCT CAA GCT CTT



(Продължение)

70

80

Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu  
CAG CTG GCT GGT TGT CTG TCT CAA CTG CAT TCT GGT CTG TTC CTG TAT CAG GGT CTT CTG

90

100

Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp  
CAA GCT CTG GAA GGT ATC TCT CCG GAA CTG GGT CCG ACT CTG GAC ACT CTG CAG CTA GAT

110

120

Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met Ala Pro Ala  
GTA GCT GAC TTT GCT ACT ACT ATT TGG CAA CAG ATG GAA GAG CTC GGT ATG GCA CCA GCT

130

140

Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly  
CTG CAA CCG ACT CAA GGT GCT ATG CCG GCA TTC GCT TCT GCA TTC CAG CGT CGT GCA GGA

---

(Продължение)

150

Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg  
GGT GTA CTG GTT GCT TCT CAT CTG CAA TCT TTC CTG GAA GTA TCT TAC CGT GTT CTG GGT

160

170

His Leu Ala Gln Pro

CAT CTG GCT CAG CCG TAA TAG AAT T

174

Таблица 16

---

1 ATCGATTTGATTC TAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTACCCAT  
TAGCTAAACTAAGATCTTCCTCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCCCATGGTA

1 Clal, 12 Xbal, 29 NdeI, 35 HincII, HpaI, 39 MloI, 47 EcoRII,  
53 HgiCI KpnI, 57 NcoI StyI.

61 GGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGATAAATAAGTAACGATCC  
CCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTATTTATTTCATTGCTAGG

63 HindIII, 70 AvaI XhoI, 75 BamHI Xho2, 79 Sec2

---

Плазмид Ppo2, съдържащ hpG-CSF гена, показан на таблица 7, се смилва с HgiAI и StuI като се предоставя фрагмент от приблизително 645 базови двойки, включващ гена на зрелия hpCSF (както е показано на таблица 7) със седем остатъчни кодони на лидерната последователност в 5' края и приблизително 100 базови двойки от 3' некодиращата област. Смилане с HgiAI води до 5' 4-базов леплив край, идентичен на този от PstI, а StuI води до тъпи краища. Това позволява бързо инсериране на фрагмента в M13 mp8 (Rf), срязан с PstI и с рестрикционния ензим HincII, образуващ тъпи краища. След амплифициране в M13, hpG-CSF ДНК се изрязва чрез смилане с ApaI и BamHI, които съответно срязват при ApaI сайта, разполагайки кодоните за остатъци +3 до +5 на hpCSF и при BamHI сайта в посока "downstream" на HincII сайта в M13 mp8 рестрикционния полилинкер. С цел да се позволи експресията на hpG-CSF полипептида в E. coli, се изготвя синтетичен фрагмент, както е показано на таблица 17 по-допу.

Таблица 17

---

5' - C TAG AAA AAA CCA AGG AGG TAA TAA ATA

3'- TTT TTT GGT TCC TCC ATT ATT TAT

XbaI

-1 +1

Met Thr Pro Leu

ATG ACA CCT CTG GGC C-5'

TAC TGT GGA GAC - 3'

ApaI

---

Както може да бъде определено от анализа на таблица 17, линкерът включва ApaI леплив край, кодони, характеризиращи първоначалните три остатъка от аминокрая на hpG-CSF ("възстановяващ" Thr<sup>1</sup>, Pro<sup>2</sup>, Leu<sub>3</sub> – характеризиращи кодони, делетирани след смилане с ApaI на M13 ДНК описано по-горе и при използване на кодони, за предпочитане експресирани в *E. coli*) инициращ трансслацията ATG, последователност от 24 базови двойки, предоставяща сайт за свързване на рибозоми, и XbaI леплив край.

Експресионният вектор, използван за експесиране в *E. coli* е този, описан като pCFM536 в заявка за Европейски Патент No 136,490 от Morris, публикувана на 10.04.1985. (Виж също А.Т.С.С. 39934, *E. coli* JM103 съдържащ pCFM536). Накратко, плазмид pCFM536 се смилва с XbaI и BamHI. hpG-CSF фрагментът (ApaI/BamHI) и линкер (XbaI/ApaI), описан по-горе, след това се лигира към него, за да образува плазмид, означен като p536Pro2.

Плазмид p536Pro2 се трансформира във вариант на *E. coli* щам AM7, устойчив на фаги, който предварително е трансформиран с плазмид pMW1 (А.Т.С.С. No 39933) включващ *CI<sup>857</sup>* ген. Трансформирането се проверява на основата на маркерен ген (*amp*) за устойчивост на антибиотици, пренесен от родителски плазмид pCFM536. Култури на клетки в LB бульон (ампицилин 50 µg 1 ml) се поддържа при 28°C и след прорастването на клетките в културата до A600=0,5, hpCSF експресията се индуцира чрез повишаване температурата на култивиране до 42°C в

продължение на 3 часа. Крайната O.D. на културата е  $A_{600}=1,2$ .

Определено е върху SDS-полиакриламиден гел, оцветен с coomassie blue багрило, че степента на експресирание на hrG-CSF от трансформираните клетки е 3-5% от общия клетъчен протеин.

Клетките се събират чрез центрофугиране при 3500 g в продължение на 10 минути в JS-4.2 ротор. Клетки при 25% (тегло/обем) във вода се разрушават чрез трикратно преминаване през French Pressure Cell при 10 000 p.s.i. Суспензията от разрушени клетки се центрофугира при 10 000 g в продължение на 15 минути на JA-20 ротор. Плътната утайка се суспендира отново във вода и се разтваря до приблизително 5 mg/ml общ протеин в 1% лауринова киселина, 50 mM Tris, pH 8,7. Разтворената плътна утайка се центрофугира при 15 000 g в продължение на 10 минути и към супернатантата се прибавя  $CuSO_4$  до 20 mM. След 1 час тази проба се пропуска на C4 BETX колона за пречистване съгласно процедурите от пример 1 (Б) с нагласяване на обема и концентрацията.

Разработва се втора процедура на пречистване за получаване на по-големи количества hrG-CSF в неорганичен съдържащ буфер. Този продукт е подходящ за *in vivo* изследвания. 150 грама клетъчна паста отново се суспендира в приблизително 600 ml 1 mM DTT и 4 пъти се пропуска през Manton Gualin Homogenizer при приблизително 7 000 PSI. Суспензията от разрушени клетки се центрофугира при 10 000 g за 30 минути и плътната утайка отново се суспендира в 400 ml 1% дезоксихолат (DOC), 5 mM EDTA, 5 mM DTT и 50 mM

Tris, рН 9. Тази суспензия се разбърква при стайна температура в продължение на 30 минути и се центрофугира при 10 000 g в продължение на 30 минути. Плътната утайка отново се суспендира в приблизително 400 ml вода и се центрофугира при 10 000 g в продължение на 30 минути. Плътната утайка се разтваря в 100 ml 2% Sarkosyl и 50 mM Tris при рН 8. Прибавя се  $\text{CuSO}_4$  до 20  $\mu\text{M}$  и сместта се разбърква 16 часа при стайна температура, след което се центрофугира при 20 000 g в продължение на 30 минути. Към супернатантата се прибавят 300 ml ацетон. Сместа се слага върху лед в продължение на 20 минути, след което се центрофугира при 5 000 g в продължение на 30 минути. Плътната утайка се разтваря в 250 ml 6M гуанидин и 40 mM натриев ацетат при рН 4, и се слага върху 1,200 ml G-25 уравновесена колона и се пропуска в 20 mM натриев ацетат при рН 5,4. Пикът на hpG-CSF (около 400 ml) се обединява и се зарежда върху 15 ml-ова колона CM-целулоза, уравновесена в 20 mM натриев ацетат при рН 5,4. След зареждане колоната се промива с 60 ml 20 mM натриев ацетат при рН 5,4 и с 25 mM натриев хлорид, след което колоната се елуира с 200 ml 20 mM натриев ацетат при рН 5,4 и с 37 mM натриев хлорид. 150 ml от този елуент се концентрират до 10 ml и се прилагат към 300 ml G-75 уравновесена колона и се пропускат в 20 mM натриев ацетат и 100 mM натриев хлорид при рН 5,4. Пиковите фракции, съдържащи 35 ml, се обединяват и се стерилизират през филтър. Крайната концентрация на hpG-CSF, която е 1,5 mg/ml е с чистота над 95% чистота, както е определено чрез анализ върху гел и съдържа по-малко от 0,5 ng пироген на 0,5 mg hpG-CSF.

Нивото на пироген се определя при използване на тестов комплект Limulus Amebocyte Lysate (LAL) (M.A. Bioproducts, Walkersville, Md).

#### ПРИМЕР 8

Настоящият пример се отнася до използване на рекомбинантни методи за генериране на аналози на hpG-CSF, при което цистеиновите остатъци, присъстващи в позиции 17, 36, 42, 64, и 74 поотделно са заместени с подходящ аминокиселинен остатък.

Провеждат се процедури за сайт насочен мутагенез съгласно Souza, et al., публикувана PCT заявка No WO85/00817, публикувана на 28.02.1985, върху [Met<sup>1</sup>] кодираща ДНК на плазмид р536Pro2, описан по-долу, при използване на синтетични олигонуклеотиди с размер от 20 до 23 бази, както е посочено в таблица 18 по-долу. Олигонуклеотид No 1 позволява образуването на ген, кодиращ [Ser<sup>17</sup>] hpG-CSF; олигонуклеотид No 2 позволява образуването на [Ser<sup>36</sup>] hpG-CSF, и т.н.

Таблица 18

Олиго-

нуклеотид

Последователност

- |    |  |
|----|--|
| 1. | 5' –CTG CTC AAG TCC TTA GAG CAA GT -3' |
| 2. | 5' –GAG AAG CTG TCT GCC ACC TACA - 3'  |
| 3. | 5' –TAC AAG CTG TCC CAC CCC GAG – 3'   |



(Продължение)

4. 5' –TGA GCA GCT CCC CCA GCC AG-3'

5. 5' –CTG GCA GGC TCC TTG AGC CAA-3'

Рестрикциите на сайт насоченият мутагенез от Cys до Ser се провеждат при използване на M13 mp10, съдържащ XbaI-BamHI hpG-CSF фрагмент, изолиран от p536Pro2 като матрица. ДНК от всеки M13mp10 клон, съдържащ Cys-Ser заместване се третира с XbaI и BamHI. Полученият фрагмент се клонира в експресионен вектор pCFM746 и продуктите на експресията се изолират както в пример 7.

Плазмид pCFM746 може да бъде конструиран чрез разцепване на плазмид pCFM736 (конструирането на който, от депозиран и достъпни за обществото материали, е описано в Morris, публикувана РСТ заявка No WO85/00829, публикувана на 28.02.1985) с ClaI и BamHI за отстраняване на съществуващ полилинкер и чрез заместването на следния полилинкер.

Таблица 19

ClaI

5' CGATTTGATTCTAGAATTCGTTAACGGTACCATGGAA

3' TAAACTAAGATCTTAAGCAATTGCCATGGTACCTT

GCTTACTCGAGGATCCGCGGATAAATAAGTAAC<sup>3'</sup>CGAATGAGCTCCTAGGCGCCTATTTATTTCATTGCTAG<sup>5'</sup>Sau3a

При процеса на пречистване на аналози на Cys до Ser съгласно настоящото изобретение, приблизително 10-15 g клетъчна паста се ресуспендират в 40 ml 1 mM DTT и три пъти се прокарват през French Pressure Cell при 10 000 psi. Суспензията от разрушени клетки се центрофугира при 1000 g за 30 минути. Плътната утайка се суспендира отново в 1% DOC, 5 mM EDTA, 5 mM DTT, 50 mM Tris, pH 9 и се разбърква 30 минути при стайна температура. Сместта се центрофугира при 10 000 g за 30 минути, отново се суспендира в 40 ml H<sub>2</sub>O и отново се центрофугира при 10 000 g за 30 минути. Плътната утайка се разтваря в 10 ml 2% Sarkosyl, 50 mM DTT, 50 mM Tris, pH 8. След разбъркване в продължение на един час сместта се избистря чрез центрофугиране на 20 000 g в продължение на 30 минути, след което се прилага на 300 ml-ова G-75 уравновесена колона и се пропуска в 1% Sarkosyl, 50 mM Tris, pH 8. Фракциите, съдържащи аналога, се обединяват и се оставят да се окислят на въздух чрез излагането им на въздух поне за 1 ден. Крайните концентрации варират от 0,5 – 5 mg/ml.

#### ПРИМЕР 9

В този пример експресионна система от клетки на бозайници се разделя, за да се удостовери дали един активен полипептиден продукт на hpG-CSF ДНК би могъл да бъде ЕКСПРЕСИРАН във и секретирани от клетки на бозайници (COS-1, A.T.C.C. CRL 1650). Тази система е проектирана да осигури секретирани на полипептиден аналог на hpG-CSF чрез експресионен и секреторен процесинг на частично синтетичен, частично получена от сДНК кодираща структура [Ala<sup>1</sup>] hpG-

CSF , предхождана от лидерен полипептид , притежаващ последователността от остатъци на приписана на човек GM-CSF във Wong, et al., Science, 228, 810-815 (1985) и Lee et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82, 4360 – 4364 (1985).

Експресионният вектор , използван за предварителни изследвания на полипептидните продукти на експресията от изобретението е вектор “совалка”, включващ и двете pBR322 и SV40 ДНК, които са били проектирани , за да позволят автономна репликация в E. coli, както и в клетки от бозайници, с експресия в клетките на бозайници на инсерирана екзогенна ДНК под контрола на вирусна промоторна/регулаторна ДНК последователност. Този вектор, означен като pSVDM-19, се пренася от E. coli 101, депозиран на 23.08.1985 в American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Md., и входящ номер No A.T.C.C. 53241.

Специфичните манипулации , включени в конструкцията на експресионния вектор , са както следва. Лидерна–кодираща ДНК последователност се синтезира , както е посочено в таблица 20 по-долу.

Таблица 20

---

	-17
<u>HindIII</u>	Met Trp
5' - A GCT TCC AAC ACC ATG TGG	
3' - AGG TGG TGG TAC ACC	

---

(Продължение)

-10

Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu Gly Thr Val  
 CTG CAG AGC CTG CTG CTC TTG GGC ACT GTG  
 GAC GTC TCG GAC GAC GAG AAC CCG TGA CAC

-1 +1

Ala Cys Ser Ile Ser Ala Pro Leu  
 GCC TGC AGC ATC TCT GCA CCC CTG GGC G -3'  
 CGG ACG TCG TAG AGA CGT GGG GAC -5'

ApaI

Както е посочено в таблица 20, последователността включва HindIII и ApaI лепливи краища и кодони за 17 аминокиселинни остатъци, приписвани на "лидер" от човешки GM-CSF. Следват кодони, характеризиращи аланинов остатък, пролинов остатък и левцинов остатък. Пролиновите и левциновите остатъци дублират аминокиселините, присъстващи в позиции +2 и +3 на hpG-CSF, докато аланиновият остатък е предимно дублиращ на първоначалния аминокиселинен терминален (+1) остатък на GM-CSF, отколкото на hpG-CSF. Заместването на треонин от аланин е проектирано, за да улесни правилния "processing off" в клетката-гостоприемник на GM-CSF лидер чрез клетъчни механизми, обикновено включени в GM-CSF секреторния процесинг.

Плазмид pSVDM-19 се смилва с KpnI и сайтът се прави с тъп край с ензим на Klenow. След това ДНК се скъсва с HindIII. Полученият голям фрагмент се комбинира и лигира с

HindIII/PvuII фрагмент, показан на таблица 7 (изолиран от плазмид Ppo2, като вторият най-голям фрагмент, получен от смилане с HindIII и частично смилане с PvuII), за да образува плазмид pSV-PpoI. Произведеният фрагмент на GM-CSF лидерна последователност от таблица 8 след това се лигира в pSV-PpoI (след неговото скъсване с HindIII и ApaI), за да се получи плазмид pSVGM-PpoI.

ДНК на плазмид pSVGM-PpoI, утаена с калциев фосфат (1-5 µg), се трансформира с повторение в 60 mm-ови блюда с COS-1 клетки по същество, както е описано от Wigler, et al., Cell, 14, 725-731 (1978). Като контрола плазмид pSVDM-19 също се трансформира в COS-1 клетки. Супернатанти от тъканна култура се събират 5 дни след трансфекцията и се изследват за hpG-CSF активност. Добивът на [Ala<sup>1</sup>] hpG-CSF от супернатантата на културата е в рамките от 1 до 2,5 µg/ml.

След успешното експресиране на [Ala<sup>1</sup>] hpG-CSF продукта, кодиран от плазмид pSVGM-PpoI, в COS-1 клетки се конструира друг вектор, който включва човешка GM-CSF лидерна последователност, но притежаваща кодон за треонинов остатък (естествено, намиращ се позиция 1 на hpG-CSF), който замества кодона за аланин в тази позиция. Накратко, синтезира се олигонуклеотид (5' CAGCATCTCTACACCTCTGGG) за сайт насочен мутагенез (SDM). HindIII до BamHI hpG-CSF фрагмента в pSVGM-PpoI се лигира в M13 mp10 за SDM. Новосинтезираният hpG-CSF ген, съдържащ Thr кодон в позиция 1, се изолира чрез разцепване с HindIII и EcoRI. След това фрагментът се клонира в pSVDM-19, изготвен чрез разцепване със същите две рестрикционни ендонуклеази. Полученият вектор pSVGM-Ppo(Thr) се

трансформира в COS клетки и добивът на hpG-CSF, измерен в супернатантата на културите, е в границите от 1 до 5 µg/ml.

Накрая геномната последователност, чието изолиране е описано в пример 5, се използва за образуване на експресионен вектор за експресия на hpG-CSF в клетки на бозайници. По-специално, pSVDM-19 се смила с KpnI и HindIII и големият фрагмент се използва в четирипосочно лигиране със синтетичен линкер с HindIII и NcoI лепливи краища, както е показано на таблица 21. NcoI-BamHI фрагмент, съдържащ екзон 1, изолиран от pBR322 (8 500 hpG-CSF), геномен субклон, и BamHI-KpnI фрагмент, съдържащ екзони 2-5, изолирани от плазмид pBR322 (8 500 hpG-CSF, геномен субклон). Полученият експресионен вектор за бозайници, pSV/ghG-CSF продуцира 1 до 2,5 µg/ml hpG-CSF от трансформирани COS клетки.

Таблица 21

---

HindIII  
 5' AGCTTCCAACAC  
 AGGTTGTGGTAC<sup>5'</sup>  
NcoI

---

#### ПРИМЕР 10

Този пример се отнася до физичните и биологични свойства на рекомбинантни полипептидни продукти на настоящото изобретение.

##### 1. Молекулно тегло

Рекомбинантни hpG-CSF продукти от експресия в *E. coli*, както в пример 7, имат явно молекулно тегло от 18,8 kD при

определяне с редуцираща SDS-PAGE (както би било предсказано от изведения аминокиселинен анализ от таблица 7, където естествени изолати, като описаните в пример 1, имат явно молекулно тегло от 19,6 kD. Присъсъствието на N-гликани, асоциирани с естествени изолати, действително може да бъде изключено на основата на липса на аспергинови остатъци в първичната последователност на hpG-CSF от таблица 7 и, следователно, се отделя процедура за определяне дали O-гликани са отговорни за разликата в молекулното тегло между естествени изолати и негликозилираните рекомбинантни продукти. Приблизително 5 µg материал от естествен изолат се обработват с неврамидаза (Calbiochem, LaJolla, California), отстранява се проба от 0,5 µg и останалият материал се инкубира с 4 mU O-гликаназа (ендо-х-п-ацетилгалактозаминидаза, Genzyme, Boston, Mass.) при 37°C. Аликвотни части се отстраняват след 1/2, 2 и 4 часа от инкубирането. Тези проби се подлагат на SDS-PAGE една до друга с рекомбинантен продукт, произлизащ от *E. coli*. След обработването с неврамидаза явното молекулно тегло на изолата се измества от 19,6 kD на 19,2 kD, което подсказва отстраняването на остатък на сиалова киселина. Два часа след обработването с O-гликаназа явното молекулно тегло се измества от 18,8 kD – идентично с явното молекулно тегло на продукт, произлизащ от *E. coli*. Чувствителността на въглехидратната структура към неврамидаза и O-гликаназа подсказва следната структура за въглехидратната съставка: N-ацетил-невраминова киселина-а(2-6)галактоза β (1-3) N-ацетилгалактозамин -R, където R е серин или треонин.

## 2. <sup>3</sup>H-тимидин ориентиране

Индуцирането на пролиферация на клетки от костен мозък на човек се изследва на основата на повишено включване на <sup>3</sup>H-тимидин. Човешки костен мозък от здрави донори се подлага на плътностно срязване с Ficoll-Huраque (1.077 g/ml Pharmacia) и клетките с ниска плътност се суспендират в Iscove's среда (GIBCO), съдържаща 10% зародишен говежди серум и глутамин pen-strep. След това  $2 \times 10^4$  клетки от костен мозък на човек се инкубират или с контролна среда или с материал от рекомбинантна E. coli от пример 7 в 96-ямкови блюда с плоско дъно при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> на въздух в продължение на два дни. Пробите се изследват в повторение и концентрацията варира над 10 000 пъти. След това в културите се прокарват в продължение на 4 часа с 0,5 μCi/ямка <sup>3</sup>H-тимидин (New England Nuclear, Boston, Mass.). <sup>3</sup>H-тимидин ориентирането се измерва, както е описано в Ventua, et al., Blood, 61, 781 (1983). В това изследване човешки hpG-CSF изолати могат да се индуцират с включване на <sup>3</sup>H-тимидин в клетки от костен мозък на човек, при приблизителни нива 4-10 пъти по-високи от контролните супернатанти. hpG-CSF продукт, произлизащ от E. coli от пример 6 притежава подобни свойства.

Провежда се второ изследване на пролиферацията на клетки от костен мозък на човек при използване на културална среда на трансфектирани COS-1 клетки, както е приготвена в пример 9, и дава подобни резултати, което показва, че кодираните полипептидни продукти действително се секретират в културалната среда като активни продукти.



### 3. WENI – 3B D+ индуциране на диференциация

Способността на рекомбинантни продукти, произлизащи от *E. coli* да продуцират диференциация на миши миеломоноцитна левкемична клетъчна линия WENI – 3B D+, се изследва в полутвърда агарова среда както е описано в Metcalf, *Int. J. Cancer*, 25, 225 (1980). Рекомбинантният hrG-CSF продукт и контроли на средата се инкубират с 60 WENI – 3B D+ клетки/ямка при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> на въздух в продължение на 7 дни. Пробите се инкубират в 24 ямкови блюда с плоско дъно и концентрациите варират над 2 000 пъти. Колониите се класифицират като недиференцирани, частично диференцирани или напълно диференцирани и преброяването на клетъчните колонии се извършва под микроскоп. Открито бе, че рекомбинантният продукт от *E. coli* индуцира диференциране.

### 4. CFU-GM, BFU-E и CFU-GEMM изследвания

Открито бе, че естествени изолати от плурипотентен човешки G-CSF (hrG-CSF) и рекомбинантен плурипотентен човешки G-CSF (rhrG-CSF) причиняват пролиферация и диференциация на клетки от костен мозък на човек. Тези действия се измерват при CFU-GM [Broxmayer, et al., *Exp. Hematol.*, 5, 87, (1971)] BFU-E и CFU-GEMM изследвания [Lu, et al., *Blood*, 61, 250 (1983)] при използване на ниска плътност, не прилепващи клетки от костен мозък на здрав човек доброволец. Сравнение на CFU-GM, BFU-E и CFU-GEMM биологичните активности чрез използване на 500 единици hrG-CSF или rhrG-CSF са показани на таблица 22 по-долу.

Всички изследвания на колониите са проведени с ниска плътност, не прилепващи клетки от костен мозък. Клетки от

костен мозък на човек се подлагат на плътностно срязване с Ficoll-Huраque (плътност, 1,077 g/cm<sup>3</sup>; Pharmacia). След това клетките с ниска плътност отново се суспендират в Iscove's модифицирана Dulbecco's среда, съдържаща зародишен телешки серум и се поставят за адхезия върху Falcon блюда с тъканна кутура (No 3003, Vecton Dickenson, Cockeysville, Md.) за 1½ часа при 37°C.

Таблица 22

	CFU-GM	BFU-E	CFU-GEMM
Среда	0±0	26±1	0±0
Неутрален hpG-CSF	83±5.4	83±6.7	4±0
rhpG-CSF	87±5	81±0.1	6±2

Контролната среда се състои от Iscove's модифицирана Dulbecco's среда плюс 10% FCS, 0,2 mM хемин и една единица ракомбинантен еритропоетин.

За CFU-GM изследването клетките мишени се посяват при  $1 \times 10^5$  в 1 ml 0,3% агарова културална среда, която включва допълнена McCoy's 5A среда и 10% топлинно инактивиран зародишен телешки серум. Културите се преброяват за колонии (над 40 клетки на агрегат) и морфологично се определят на 7-мия ден от култивирането. Броят на колонии е показан като средно от  $\pm$ SEM, както е определено от блюда в четири повторения.

За BFU-E и CFU-GEMM изследването, клетки ( $1 \times 10^5$ ) се прибавят към 1 ml смес на Iscove's модифицирана Dulbecco's среда (Gibco), 0,8% метилцелулоза, 30% зародишен телешки серум, 0,05 nM 2-меркаптоетанол 0,2 mM хемин и една

единица рекомбинантен еритропоетин. Блюдата се инкубират във влажна атмосфера на 5% CO<sub>2</sub> и 5% O<sub>2</sub>. Ниско кислородно налягане се получава при използване на оксиредюсер от Reming Bioinstruments (Syracuse, N.Y.). Колониите се преброяват след 14 дни инкубиране. Броят на колониите е показан като тяхната средна стойност  $\pm$  SEM, както е определено от дублираните блюда.

За всички колонии, образувани при CFU-GM изследването бе открито, че са хлорацетат естераза позитивни и негативни към неспецифична естераза (алфа-нафтил ацетат естераза), което съответства с колониите гранулоцитни по тип. И за двата естествени hrG-CSF и rhpG-CSF е открито, че притежават специфична активност на приблизително  $1 \times 10^8$  U/mg чист протеин, при изследвания със серийно разреждане при CFU-GM изследването. BFU-E и CFU-GEMM данните от таблица 22 са представителни за три отделни експеримента и са подобни на данните, посочени преди това за естествен hrG-CSF. Важно е да се отбележи, че rhpG-CSF е изключително чист и лишен от други потенциални растежни фактори на бозайници, благодарение на продуцирането му в *E. coli*. Следователно rhpG-CSF е способен да поддържа образуването на смесени колони (CFU-GEMM) и BFU-E когато се прибавя в присъствие на рекомбинантен еритропоетин.

##### 5. Изследване за клетъчно свързване

Докладвано е преди това, че WEHI-3B (D<sup>+</sup>) клетки и човешки левкемийни клетки от новодиагностицирани левкемии свързват <sup>125</sup>I-белязан миши G-CSF, и че това свързване може да бъде пълно чрез прибавяне на небелязан GCSF или човешки CSF- $\beta$ . Тества се способността на

естественния hrG-CSF и rhpG-CSF да се съревновават при свързването на  $^{125}\text{I}$ -hrG-CSF към човешки и миши левкемични клетки. Високопречистен естествен hrG-CSF (>95% чистота; един  $\mu\text{g}$ ) се йодира [Tejedor, et al., Anal. Biochem., 127, 143 (1982)], отделя се от реагиращите вещества чрез гел филтрация и йонообменна хроматография. Специфичната активност на естественния  $^{125}\text{I}$ -hrG-CSF е приблизително 100  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  протеин. Миши WEHI-3B ( $\text{D}^+$ ) и два препарата на миелоидни левкемични клетки от периферна кръв на човек (ANLL, едните класифицирани като M4, другите като M5B), се тестват за тяхната способност да свързват  $^{125}\text{I}$ -hrG-CSF.

Мишите и прясно получените миелоидни левкемични клетки от периферна кръв на човек трикратно се промиват с PBS/1% BSA. WEHI-3B( $\text{D}^+$ ) клетки ( $5 \times 10^6$ ) или свежи левкемични клетки ( $3 \times 10^6$ ) се инкубират в повторение в PBS/1% BSA (100  $\mu\text{l}$ ) при отсъствие или присъствие на различни концентрации (обем: 10  $\mu\text{l}$ ) небелязан hrG-CSF, rhpG-CSF или GM-CSF и в присъствие на  $^{125}\text{I}$ -hrG-CSF (приблизително 100 000 cpm или 1 ng) при  $0^\circ\text{C}$  за 90 минути (общ обем: 120  $\mu\text{l}$ ). След това клетките отново се суспендират и се разстилат на слой над 200  $\mu\text{l}$  ледено-студен FCS в 350  $\mu\text{l}$  пластмасови центрофужни епруветки и се центрофугират (1 000 g; 1 минута). Плътната утайка се събира чрез изрязване на дъното на епруветката и плътната утайка и супернатантата се изброяват поотделно в гама брояч (Packard).

Специфичното свързване (cpm) се определя като общо свързване при отсъствие на компетитор (средно от повторенията) минус свързването (cpm) в присъствието на стократен излишък на небелязан hrG-CSF (неспецифично

свързване). Неспецифичното свързване максимално е 2 503 cpm за WEHI-3B (D<sup>+</sup>) клетки, 1 072 cpm за ANLL (M4) клетки и 1 125 cpm за ANLL (M5B) клетки. Експерименти 1 и 2 се провеждат в различни дни при използване на същите препарати <sup>125</sup>I-hpG-CSF и се изобразява вътрешната същност в процентно инхибиране, регистрирано за 2 000 единици hpG-CSF. Получените данни са посочени на таблица 23 по-долу.

Таблица 23

Компетитор	(U/ml)	WEHI-3B(D <sup>+</sup> )		ANLL(M4)		ANLL(M5B)	
		cpm	% инхиб.	cpm	% инхиб.	cpm	% инхиб.
<u>Опит 1</u>	0	6,608	-	1,218	-	122	-
няма							
естествен	10,000	685	90				
hpG-CSF:	2,000	1,692	74	34	97	-376	0
	200	2,031	69				
rhG-CSF:	10,000	0	100				
	2,000	1,185	82	202	83	0	0
	200	2,330	65				
<u>Опит 2</u>							
няма	0	2,910	0				
естествен							
hpG-CSF:	2,000	628	78				
GM-CSF:	2,000	3,311	0				

Както е показано на таблица 23,  $^{125}\text{I}$ -hrG-CSF показва свързване към WEHI-3B ( $\text{D}^+$ ) левкемични клетки. Свързването се инхибира по зависим начин от небелязан естествен hrG-CSF или rhrG-CSF, но не и от GM-CSF. Освен това се наблюдава свързване на естествения hrG-CSF към човешки миеломоноцитни левкемични клетки (ANLL, M4). Свързването към тези клетки е паралелно по отговор на естествен hrG-CSF в течни култури чрез диференциране в зрели макрофаги, както се съди по морфологията. Отсъствието на свързване на естествения  $^{125}\text{I}$ -hrG-CSF към моноцитни левкемични клетки от друг пациент (ANLL, M5B) подсказва, че някои левкемии могат диференциално да експресират или да им липсват рецептори за hrG-CSF. Способността на rhrG-CSF да се съревновава за свързването на естествения  $^{125}\text{I}$ -hrG-CSF, подобно на естествения hrG-CSF подсказва, че рецепторите еднакво добре разпознават и двете форми.

Тези изследвания, демонстриращи свързването на естествения  $^{125}\text{I}$ -белязан hrG-CSF към левкемични клетки, са паралелни в култура по способността на естествения hrG-CSF да индуцира диференциране на гранулоцити и моноцити на клетки от костен мозък с ниска плътност, получени от един пациент с остра промиелоцитна левкемия (M3) и втори пациент с остра миелобластна левкемия (M2). Клетки от всеки пациент се култивират 4 дни само в среда или в присъствието на  $1 \times 10^5$  единици rhrG-CSF. Клетки от M3 контролни култури, инкубирани само в среда, все още са промиелоцитен тип; докато клетки, култивирани в присъствие на rhrG-CSF, показват зрели клетки от миелоиден тип, включително метамиелоцити,

гигантоивична форма и сегментирани неутрофили и моноцити. Действителното диференциално броене за този пациент, върху 100 клетки, изчислени спрямо контролата, 100% промиелоцити, и за клетки, третирани с  $\text{rhpg-CSF}$ ; 22% бласти плюс промиелоцити, 7% миелоцити, 35% метамиелоцити, 20% ивични форми плюс сегментирани неутрофили, 14% моноцити и 2% макрофаги. Трябва да се отбележи факта, че един от полиморфонуклеарните гранулоцити все още съдържа забележителен *aueg rod*, което подсказва, че поне тази клетка представя диференциална клетъчна принадлежност към левкемичния клон. Клетки от втория пациент с миелобластна левкемия (M2) също се култивират четири дни в присъствие или отсъствие на  $\text{rhpg-CSF}$ . Визуалният анализ на M2 клетки, култивирани само в среда, показват големи "бластоподобни" клетки, някои от които притежават ядрени телца. Някои от M2 клетките при третиране с  $\text{rhpg-CSF}$  се диференцират до зрели сегментирани неутрофили, показващи остатъчни *aueg rods* в центъра на неутрофилите, което подсказва диференциране, протичащо в клетка принадлежаща на левкемичен клон. Действителното диференциране на сто клетки, оценени морфологично, показва, че контролните клетки се състоят от 100% бласти. Клетки, третирани с  $\text{rhpg-CSF}$ , се състоят от 43% бласти, 1% миелоцити, 15% метамиелоцити, 28% ивични форми плюс сегментирани неутрофили, 2% промоноцити и 11% моноцити. Левкемичните клетки също се проверяват за диференциране при четири други концентрации на  $\text{rhpg-CSF}$  ( $5 \times 10^3$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$  и  $5 \times 10^4$  U/ml, данните не са показани). Даже и при най-ниските тествани концентрации ( $5 \times 10^3$  U/ml) на  $\text{rhpg-CSF}$  има значително

дифенциране (клетките се диференцират отвъд МИЕЛОЦИТИТЕ) на М3 (50%) и М2 (37%) левкемични клетки.

#### 6. ИМУННО ИЗСЛЕДВАНЕ

За получаване на поликлонални антитела за имунно изследване използваният антиген е плурипотентен G-CSF, пречистен от карциномна клетъчна линия 5637 (1A6) от пикочен мехур на човек, както се получава в пример 1 (B). Преценява се, че този продукт е 85% чист на основата на оцветяване на полиакриламидни гелове със сребърен нитрат. Balb/C мишки на възраст 6 седмици се имунизират с подкожни инжекции с антиген. Антигенът се суспендира отново в PBS и се емулгира с равни обеми пълно помощно средство на Freund. Дозата е от 5 до 7  $\mu\text{g}$  антиген на мишка на инжектиране. 18 дни по-късно се прилагат спомагащи имунизации със същото количество антиген, емулгиран с равен обем непълно помощно средство на Freund. След 4 дни се взима серум от мишки за тестване на специфично антитяло за човешки плурипотентен G-CSF.

Dynatech Immulon II Removawell ивици в рамки (Dynatech Lab., Inc., Alexandria, Va.) се покриват с hpG-CSF 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  в 50 mM карбонат-бикарбонатен буфер, pH 9,2. Ямките се покриват с 0,25  $\mu\text{g}$  в обем от 50  $\mu\text{l}$ . Блюдата с покритие от антиген се инкубират два часа при стайна температура и цяла нощ при 4°C. Разтворът се отдекантира и блюдата се инкубират 30 минути с PBS, съдържащ 5% BSA за блокиране на реактивната повърхност. Този разтвор се отдекантира и разредени пре-имунни или тестови серуми се прибавят към ямките и се инкубират 2 часа при стайна температура. Серумите се разреждат с PBS, pH 7,0 съдържащ 1% BSA.



Серумният разтвор се отдекантира и блюдата се промиват трикратно с промивен разтвор (KPL, Gaithersburg, Md.). Към всяка ямка се прибавят приблизително 200 000 српт йодиран заешки АНТИМИШИ IgG (NEN, Boston, Mass.) в 50  $\mu$ l PBS, pH 7,0, съдържащ 1% BSA. След 1½ часа инкубиране при стайна температура разтворът се отдекантира и блюдата се промиват пет пъти с промивен разтвор. Ямките се изваждат от рамките и се преброяват на Beckman 5 500 гама брояч. Високотитърните миши серуми показват повече от 12 пъти по-висока реактивоспособност, отколкото съответните пре-имунни серуми при разреждане 1:100.

Имунологичните свойства на hpG-CSF, произлизащ от E. coli, се определят чрез реактивоспособността на високотитърни миши серуми, специфични към hpG-CSF, получен от клетки на бозайници. 0,25  $\mu$ g протеин с 90% чистота, получен от E. coli, се покрива с Immulon II Removawells в обем 50  $\mu$ l и мишият серум се изследва, както е описано по-горе.

Високотитърните миши серуми показват повече от 24 пъти по-висока реактивоспособност към продукт, получен от E. coli, отколкото съответните пре-имунни серуми при разреждане 1:100.

#### 7. Биоизследвания на аналог на серин

[Ser<sup>17</sup>]hpG-CSF, [Ser<sup>36</sup>]hpG-CSF, [Ser<sup>42</sup>]hpG-CSF, [Ser<sup>64</sup>]hpG-CSF и [Ser<sup>74</sup>]hpG-CSF продукти, получени съгласно пример 9, се изследват за hpG-CSF активност при изследвания за <sup>3</sup>H-тимидин ориентиране, CFU-GM и WEHI-3B D<sup>+</sup> клетки. Във всяко изследване [Ser<sup>17</sup>] аналогът е с активност, сравнима с тази на рекомбинантни молекули, притежаващи нативната структура. Останалите аналози притежават около 100 пъти по-

ниска активност при изследването за  $^3\text{H}$ -тимидин ориентиране, 250 пъти по-ниска активност при изследването за CFU-GM и 500 пъти по-ниска активност при изследването за WEHI-3B D<sup>+</sup>. Тези данни поддържат предположението, че цистеините в позиции 36, 42, 64 и 74 може да са необходими за пълна биологична активност.

#### 8. In vivo биоизследване

Alzet® осмотични помпи (Alzet Corp., Palo Alto, Calif.; Model 2001) се свързват към постоянни катетри на дясната югуларна вена и се имплантират подкожно на седем мъжки Syrian golden хамстери. Четири от помпите съдържат буфер [20 mM натриев ацетат (pH 5,4) и 37 mM натриев хлорид] и 1,5 mg/ml hpG-CSF, получен от E. coli, докато три от помпите съдържат само буфер. Претендираната скорост на осмотичните помпи е 1 микролитър/час до 7 дни. На третия ден след имплантирането на помпите средният брой гранулоцити на четирите третирани хамстера е 6 пъти по-висок от този на трите (буфер) контролни и повишеният брой гранулоцити дава отражение на четирикратно увеличение на общите лимфоцити. Броят на еритроцитите не се променя след третиране. Тези резултати показват, че рекомбинантният продукт води до специфично засилване на продуцирането и/или освобождаване на гранулоцити в бозайници.

В допълнение, към естествено съществуващите в природата алелни форми на hpG-CSF, настоящото изобретение също включва други hpG-CSF продукти като полипептидни аналози на hpG-CSF и фрагменти на hpG-CSF. Следвайки методите на горепосочената публикувана заявка на Alton, et al., (WO83/04053), специалистът в областта лесно

може да проектира и да произведе гени, кодиращи микробиална експресия на полипептиди, притежаващи първични конформации, които се различават от тук посочените по идентичността или месторазположението на един или два остатъка (например, заместване, крайно или междинно прибавяне или делеции). Алтернативно, модификации на сДНК и на геномни гени лесно може да се осъществят с добре известни техники за сайт-насочен мутагенез и да се използват за генериране на аналози и производни. Такива продукти биха споделяли най-малко едно от биологичните свойства на hpG-CSF, но могат и да се различават по други. Например планирани продукти съгласно ИЗОБРЕТЕНИЕТО включват такива, които са съкратени например чрез делеции; или такива, които са по-стабилни към хидролиза (и следователно могат да имат по-подчертан или по-дълготраен ефект, отколкото естествено съществуващите в природата); или които са били променени да делетират един или повече от потенциалните сайтове за о-гликозилиране (което може да доведе до по-високи активности на продукти, продуцирани в дрожди); или които могат да притежават един или повече цистеинови остатъка, делетирани или заместени от, например, аланинови или серинови остатъци, и потенциално по-лесно могат да бъдат изолирани в активна форма от микробиални системи; или които притежават един или повече тирозинови остатъци, заместени от фенилаланин, и могат да се свържат повече или по-малко лесно към рецептори на hpG-CSF на клетки мишени. Включват се също така полипептидни фрагменти, дублиращи само част от непрекъснатата аминокиселинна последователност или вторични

конформации в hrG-CSF, които фрагменти могат да притежават една активност (например, за свързване на рецептор), а не и други (например активност за стимулиране растежа на колонии). Трябва да се отбележи, че не е необходимо активността за някой или повече продукти от изобретението да притежават терапевтична полза [виж, Weiland, et al., Blut, 44, 173-175 (1982)] или полза в друг контекст, например изследвания за hrG-CSF антагонизъм. Компетитивните антагонисти могат да бъдат доста полезни, например при случай на свръхпродуциране на hrG-CSF.

Съгласно друг вариант на настоящото изобретение, описаната ДНК последователност, която кодира hrG-CSF полипептиди, е ценна за информацията, която се предоставя по отношение на аминокиселинната последователност на протеина от бозайници, която до сега не бе достъпна, въпреки аналитичния подход на изолиране на естествено съществуващи в природата продукти. ДНК последователностите също са очевидно ценни като продукти, полезни за извършване на микробиален синтез на hrG-CSF в голям мащаб чрез голямо разнообразие от рекомбинантни техники. От друга страна ДНК последователностите, предоставени от настоящото изобретение, се използват за генериране на нови и полезни вирусни и кръгови плазмидни ДНК-ови вектори, нови и полезни трансформирани и трансфектирани микробиални прокариотни и еукариотни клетки гостоприемници (включително бактериални и дрождеви клетки и клетки от бозайници, растящи в култура), и нови и полезни методи за прорастване в култура на такива микробиални

клетки гостоприемници, способни да експресират hpG-CSF и свързаните с него продукти. ДНК последователностите от настоящото изобретение са също така особено подходящи продукти за използване като белязани проби при изолиране на hpG-CSF и свързаните протеини, кодиращи геномна ДНК на човек, както и сДНК и геномни ДНК последователности от други видове бозайници. ДНК последователностите също могат да се използват при различни алтернативни методи за синтез на протеини (например в клетки на насекоми) или в генната терапия на хора и други бозайници. Очаква се ДНК последователностите от настоящото изобретение да се използват в развитието на трансгенни видове бозайници, които могат да послужат като еукариотни "гостоприемници" за количествено получаване на hpG-CSF и hpG-CSF продукти. Виж най-общо Palmiter, et al., Science, 222 (4625), 809-814 (1983).

За приложимостта на hpG-CSF фрагменти и полипептидни аналози на изобретението съществуват доклади за имунологична активност на синтетични пептиди, които по същество дублират съществуващите аминокиселинни последователности в естествено съществуващите в природата протеини, гликопротеини и нуклеопротеини. По-специално, за полипептидите с относително ниско молекулно тегло е показано, че участват в имунни реакции, които са подобни по времетраене и обхват на имунните реакции на физиологично значими протеини, като вирусни антигени, полипептидни хормони и други подобни. Сред имунните реакции на такива полипептиди се включва провокирането на образуване на специфични антитела в

имунологично активни животни. Виж например, Lerner, et al., 23, 309-310 (1981); Ross, et al., Nature 294, 654-656 (1981); Walter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 77, 5197-5200 (1980); Lerner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78, 3403-3407 (1981); Walter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78, 4882-4886 (1981); Wong, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78, 7412-7416 (1981); Green, et al., Cell, 28, 477-487 (1982); Nigg, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 79, 5322-5326 (1982); Baron, et al., Cell, 28, 395-404 (1982); Dreesman, et al., Nature, 295, 185-160 (1982); и Lerner, Scientific American, 248, No.2, 66-74 (1983). Виж също Kaiser, et al., Science, 223, 249-255 (1984), отнасящи се до биологичните и имунологични активности на синтетичните пептиди, които приблизително споделят вторичните структури на пептидни хормони, но не споделят тяхната първична конформация.

Тъй като настоящото изобретение е описано по отношение на предпочитаните варианти на изпълнение, трябва да се разбира, че специалистите в областта биха използвали вариации и модификации. Следователно се подразбира, че прилежащите претенции включват всички такива еквивалентни вариации, които се включват в обхвата на изобретението съгласно патентните претенции.

## ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Пречистена и изолирана ДНК последователност, състояща се по същество от ДНК последователност, кодираща човешки плурипотентен гранулоцитен колония-стимулащ фактор.

2. Пречистена и изолирана ДНК последователност съгласно претенция 1, характеризираща се с това, че посочената ДНК последователност е сДНК последователност.

3. Плазмид или вирусен ДНК-ов вектор, включващ ДНК последователност съгласно претенция 1.

4. Прокариотна или еукариотна клетка гостоприемник, стабилно трансформирана или трансфектирана с ДНК последователност съгласно претенция 1, по начин, позволяващ експресия на полурипотентен колония-стимулащ фактор.

5. Метод за получаване на полипептиден продукт, характеризиращ се с това, че се култивират при подходящи хранителни условия прокариотни или еукариотни клетки гостоприемници, трансформирани или трансфектирани с ДНК последователност, кодираща човешки плурипотентен гранулоцитен колония-стимулащ фактор по начин, позволяващ експресия на посочения полипептиден продукт, и се изолира желаният полипептиден продукт от експресията на посочената ДНК последователност.

---

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

Експерт: Св. Йорданова

Редактор: Р. Георгиева

Пор. № 40805

Тираж: 40 МВ

