



УДК 577(214.625+217.52):577.113.6

ЭКСПРЕССИЯ В *ESCHERICHIA COLI* ДНК, КОДИРУЮЩЕЙ
ФАКТОР

НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Добрынин В. Н., Беркова Н. П., Болдырева Е. Ф.,
Быстров Н. С., Гравченко В. В., Филиппов С. А.,
Чувпило С. А., Шамборант О. Г., Коробко В. Г.

Институт биоорганической химии им. М. М. Шенякина
Академии наук СССР, Москва

Описаны варианты экспрессии в *Escherichia coli* искусственной ДНК, кодирующей фактор некроза опухоли человека (ФНО) — важный иммуномодулятор, обладающий избирательным цитотоксическим действием на ряд линий опухолевых клеток. Искусственная ДНК помещена под контроль промотора гена белка оболочки бактериофага M13 и тандема двух промоторов триптофанового оперона *E. coli*. Показано, что полученные конструкции рекомбинантных плазмид обеспечивали в клетках *E. coli* SG20050 высокий уровень синтеза целевого белка. Получена плазмидная конструкция, обеспечивающая в бактериальных клетках одновременный биосинтез двух белков человека: ФНО и лейкоцитарного интерферона. Очищенный до гомогенности белок ФНО был использован для получения моноклональных антител против фактора некроза опухоли человека. В результате были получены и охарактеризованы три гибридомы (E7H2, A3E9 и D2H2), эффективно продуцирующие моноклональные антитела, обладающие высокой аффинностью к ФНО.

Фактор некроза опухоли (ФНО) — небольшой белок, продуцируемый макрофагами в ответ на бактериальную или вирусную инфекцию, а также в ответ на злокачественную трансформацию клеток. Этот белок секретируется также лейкоцитами периферической крови при их индукции митогенами, фоболовыми эфирами или интерлейкином-2 [1–3]. ФНО проявляет сильное цитотоксическое действие на ряд опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* [4–6], причем, по-видимому, этот полипептид является одним из главных цитотоксических белков, обнаруживаемых в культуральных жидкостях активированных лейкоцитов периферической крови [2].

Ранее было проведено молекулярное клонирование гена фактора некроза опухоли человека [7] и получена плазмидная ДНК pTNF2 [8], содержащая адаптированный для бактериальной экспрессии искусственный ген, кодирующий полипептид 3–157 зрелого фактора некроза опухоли человека [9], слитый своим N-концом через остаток метионина с C-концом β -галактозидазы *E. coli*. Ген фактора некроза опухоли в плазмиде pTNF2 состоит из *MspI/HindIII*-фрагмента четвертого экзона природного гена и синтетического *SalI/MspI*-фрагмента ДНК, изображенного на рис. 1а. Эта ДНК содержит иницирующий кодон ATG и кодоны для 29 N-концевых аминокислотных остатков. Следует отметить, что искусственный ген в плазмиде pTNF2 кодирует укороченный на два аминокислотных остатка с N-конца белок по сравнению с описанным в работе [9] и содержит сразу за иницирующим кодоном сайт узнавания эндонуклеазы рестрикции *XhoI*. Наличие уникального сайта *XhoI* позволяет изменять нуклеотидную последовательность перед иницирующим кодоном с целью оптимизации экспрессии гена. Что касается делеции двух N-концевых кодонов, то она была запланирована в связи с тем, что в работе [10] было показано, что такой белок при биосинтезе в клетках *Escherichia coli* подвергается посттрансляционному процессингу с отщеплением N-концевого формилметионинового остатка.

В работе использовали только дезоксирибополинуклеотиды; поэтому префикс «d» в формулах олигонуклеотидов для краткости опущен.

α

MetSerSerSerArgThrProSerAspLysProValAlaHisValValAlaAsnProGlnAlaGluGlnLeuGlnTrpLeuAsnArg 30
 TCGACCATGTCCTCGAGCCGAACCCGGAGTACAAAGCCTGTAGCCCATGTGTAGCAAAACCCTCAAGCTGAGGGGCAGCTCCAGTGGCTGAACCCGC
 GGTACAGGAGCTCGGCTTGGGGCTCAGTGAACGGACATCGGGTACAACATCGTTTGGGAGTTCGACTCCCGGTCGAGGTCACCCGACTTGGCGGC
 MspI

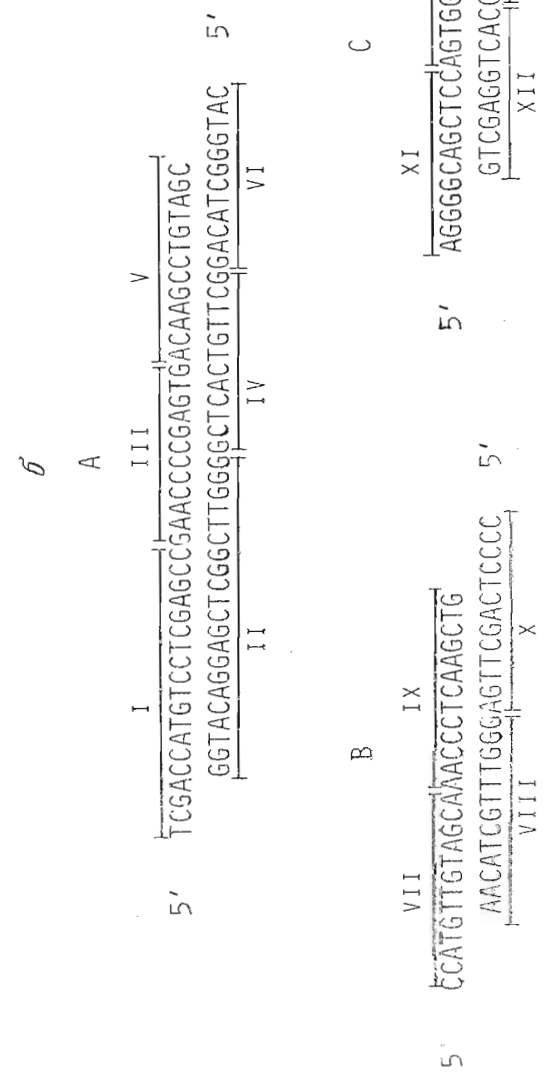


Рис. 1. N-Копцевая последовательность аминокислот фактора некроза опухоли человека и кодирующая ее синтетическая ДНК (α), а также схема проведения лигазной шивки этого фрагмента гена ФНО (β). Римскими цифрами обозначены номера химических синтезированных олигонуклеотидов. А, В, С — предварительно синтезированные сегменты ДНК

Для получения 5'-концевого фрагмента гена фактора некроза опухоли твердофазным фосфорамидитным способом [11] было синтезировано 14 олигодезоксирибонуклеотидов величиной от 11 до 20 нуклеотидных звеньев. Лигазные сшивки осуществляли в два этапа (рис. 1б). На первом этапе проводили две четырехкомпонентные и одну шестикомпонентную, причем все олигонуклеотиды перед сшивкой фосфорилировали при помощи гАТР и Т4-полинуклеотидкиназы, за исключением олигонуклеотидов I и XIV из сегментов А и С. На втором этапе сшивали лигазой сегменты А+В+С, которые предварительно очищали электрофорезом в 20% ПААГ. Получившуюся в результате 96-звенную двухцепочечную ДНК очищали электрофорезом в 15% ПААГ, а ее структуру подтверждали анализом модифицированным методом Максама — Гилберта [12] после введения метки в 5'-конец с помощью полинуклеотидкиназы.

Как уже отмечалось выше, плазмида рTNF2 кодирует биосинтез химерного белка β-галактозидаза — ФНО, в котором N-конец последнего связан через остаток метионина с С-концом β-галактозидазы. Поскольку сам ФНО не содержит в своем составе остатков метионина, он может быть отщеплен от химеры с помощью гидролиза бромцианом. Анализ суммарного белка клеток *E. coli* SG20050, содержащих плазмиду рTNF2, SDS-электрофорезом в ПААГ по Лэммли [13] свидетельствует о высоком уровне синтеза химерного белка с молекулярной массой около 132 кДа. Гидролиз суммарного клеточного белка 0,5% бромцианом в 70% муравьиной кислоте приводит к появлению белка фактора некроза опухоли, что было подтверждено определением цитотоксической активности на линии мышечных фибробластов L-929.

Получение белков путем экспрессии химерных генов не лишено ряда недостатков, связанных прежде всего с необходимостью выделения и очистки гибридного белка и трудностями последующего расщепления. В случае гибрида β-галактозидаза — ФНО химерный белок оказался чрезвычайно трудно растворимым в обычных буферных растворах, по-видимому, вследствие самоагрегации и агрегации с клеточными мембранами. Поэтому более перспективным представлялся подход, при котором реализуется прямая экспрессия гена ФНО.

В качестве одного из возможных вариантов мы использовали для этой цели векторную плазмиду рDSpv1 [14], которая за промотором гена белка оболочки фага M13 (ген VIII) содержит три терминирующих предшествующую трансляцию кодона и сайт рестриктазы *Bam*I для клонирования. Для получения экспрессирующей ФНО плазмиды векторную ДНК рDSpv1 расщепили эндонуклеазой *Bam*I, достройки выступающие концы при помощи ДНК-полимеразы *E. coli* (фрагмент Кленова), а затем обработали рестриктазой *Hind*III и выделили большой векторный фрагмент (рис. 2). С другой стороны, плазмидную ДНК рTNF2 гидролизовали рестриктазой *Sal*I и после достройки липких концов подвергали гидролизу эндонуклеазой *Hind*III. Малый фрагмент (величиной около 600 н.о.), содержащий ген фактора некроза опухоли, лигировали с векторным фрагментом, полученным из плазмиды рDSpv1. После трансформации клеток *E. coli* SG20050 проводили скрининг рекомбинантной плазмиды по устойчивости к ампициллину и хлорамфениколу, а также по положительной гибридизации с эйкозануклеотидом II. Строение плазмидной ДНК было подтверждено рестриктивным анализом с помощью эндонуклеаз *Msp*I и *Pae*III, а также определением нуклеотидной последовательности в районе сочленения фрагментов исходных плазмид.

Полученная в результате плазмида рTNF183 содержит на расстоянии 8 нуклеотидов перед инициирующим кодоном АТГ последовательность ТААГГА, представляющую протяженную последовательность Шайна — Далгарно, и поэтому должна обеспечивать экспрессию гена фактора некроза опухоли. Действительно, анализ лизатов клеток *E. coli* SG20050, трансформированных плазмидой рTNF183, показал, что бактерии обеспечивают биосинтез биологически активного белка в цитопатическом тесте в пределах $5 \cdot 10^4$ ед. акт. на 1 мл клеточного лизата, что соответствует 0,5–1 мг белка на 1 л бактериальной культуры при концентрации кле-

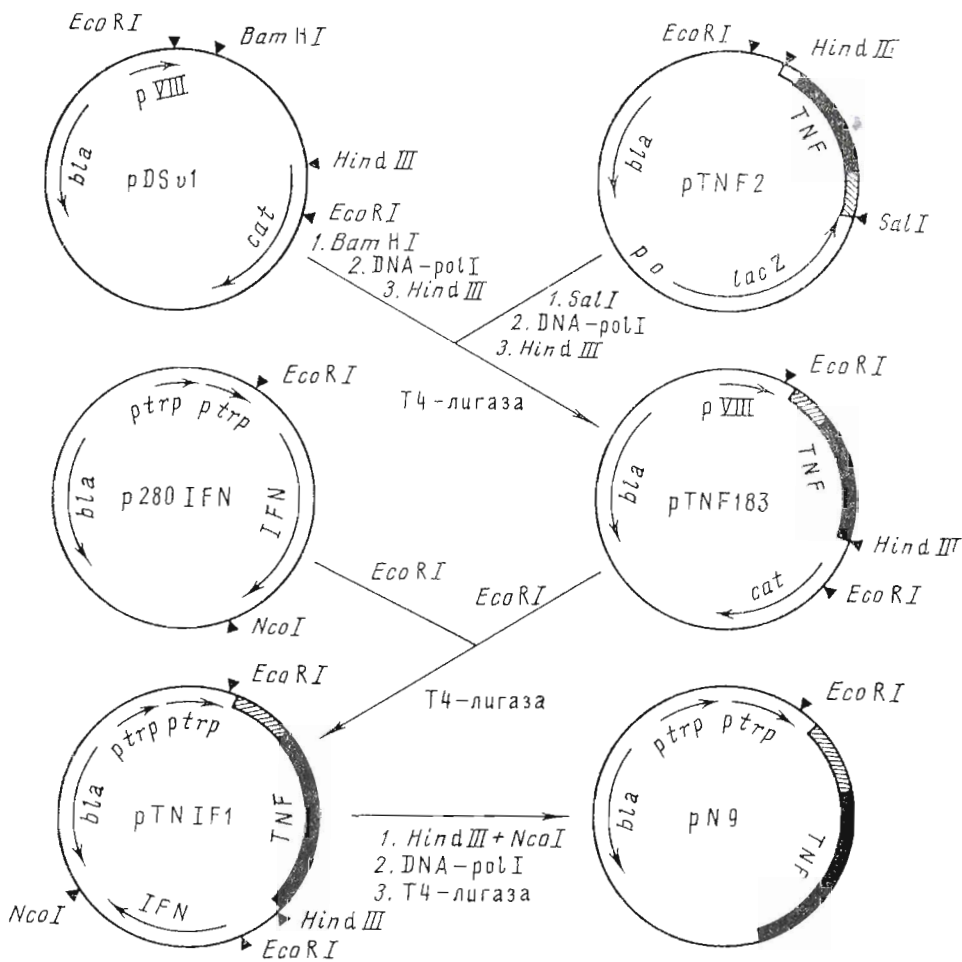


Рис. 2. Схема получения рекомбинантных плазмид, содержащих искусственный ген фактора некроза опухолей человека

ток 10^9 /мл, принимая во внимание удельную активность ФНО, равную $5 \cdot 10^7 - 10^8$ ед. акт./мг [15, 16].

Одной из причин низкого уровня экспрессии гена ФНО является, по-видимому, недостаточная эффективность транскрипции, обеспечиваемая промотором гена белка оболочки бактериофага М13. Поэтому представлялось целесообразным поместить ген фактора некроза опухоли под контроль более сильного промотора. В качестве такого регуляторного элемента мы выбрали промотор триптофанового оперона *E. coli*, который довольно часто используется для экспрессии чужеродных генов (см., например, [17, 18]). В частности, мы использовали в качестве вектора плазмиду p280IFN, которая содержит удобный для клонирования сайт рестриктазы *EcoRI* за tandemом двух триптофановых промоторов и была ранее использована нами для экспрессии в *E. coli* синтетического гена $\alpha 2$ -интерферона человека [19]. С этой целью *EcoRI*-фрагмент величиной 911 п. о. из плазмиды pTNF183, содержащий ген фактора некроза опухоли, клонировали по сайту *EcoRI* в плазмиду p280IFN. В результате после отбора рекомбинантных ДНК с правильной ориентацией вставки получили плазмиду pTNIF1, в которой под контролем tandemа триптофановых промоторов одновременно экспрессируются в *E. coli* два человеческих гена — фактора некроза опухоли и лейкоцитарного интерферона. Клетки *E. coli* SG20050, трансформированные плазмидой pTNIF1, обеспечивают биосинтез около 40 мг интерферона (по данным радиоиммуноанализа)

и 1,5–2 мг фактора некроза опухоли на 1 л бактериальной суспензии при плотности 10^9 клеток/мл.

Было бы разумно предположить, что невысокий уровень экспрессии гена фактора некроза опухоли в клетках, несущих плазмиду pTNF1, связан с тем, что, по-видимому, ресурсы бактериальной клетки в основном расходуются на суперэкспрессию гена лейкоцитарного интерферона. Поэтому мы удалили этот ген из плазмиды pTNF1. Для этого плазмидную ДНК расщепили совместным действием эндонуклеаз *Hind*III и *Nco*I, выделили большой фрагмент и лигировали его после достройки «липких» концов при помощи фрагмента Кленова ДНК-полимеразы *E. coli*. В результате получили плазмиду pN9, строение которой подтверждали рестриктивным анализом с помощью эндонуклеаз *Hae*III и *Msp*I. Анализ цитотоксической активности лизатов клеток *E. coli* SG20050, трансформированных плазмидой pN9, показал увеличение уровня экспрессии гена ФНО, однако не столь значительное, как ожидалось (около 8 мг белка на 1 л при плотности 10^9 клеток/мл). По-видимому, дальнейшую работу по повышению уровня экспрессии гена фактора некроза опухоли следует проводить на пути оптимизации участков, инициирующих трансляцию МРНК этого гена.

Штамм *E. coli* SG20050, несущий плазмиду pN9, был выращен в масштабе 5 л в LB-бульоне, содержащем 100 мкг/мл ампициллина, в течение 24 ч. С помощью ионообменной хроматографии из клеток был выделен гомогенный ФНО. Этот белок (уд. акт. $5 \cdot 10^7$ ед/мг) был использован для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела против рекомбинантного фактора некроза опухоли. С этой целью подвергали длительной иммунизации самок мышей линии Balb/c по схеме, обычно применяемой для слабых иммуногенов [20]. Для гибридизации использовали мышинные миеломные клетки линии X63Agb.653, причем слияние проводили по методу Келера и Мильштейна [21] с небольшой модификацией. В результате одной гибридизации было получено 30 стабильных клеточных линий, продуцирующих моноклональные антитела против рекомбинантного ФНО. Тестирование культуральных жидкостей на наличие антител проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа. В результате после двукратного клонирования методом предельного разведения было отобрано для дальнейшего изучения три клон гибридом (E7H2, A3E9 и D2H2), которые отличались от остальных лучшими характеристиками роста и высоким титром продуцируемых моноклональных антител (МКАТ). Для препаративного получения МКАТ гибридомы наращивали в виде массовой культуры или в виде асцитной опухоли, прививая их сингенным мышам.

Была проведена первичная характеристика полученных МКАТ. Оказалось, что все три препарата МКАТ являются иммуноглобулинами типа G1, как это было определено методом иммуноферментного анализа с использованием кроличьих антител к изотипам иммуноглобулинов мыши, конъюгированных с пероксидазой хрена. Добавление антител к клеткам мыши L-929 в цитопатическом тесте не оказывало существенного влияния на биологическую активность фактора некроза опухоли. Все полученные препараты МКАТ взаимодействуют с фактором некроза опухоли с высокой константой связывания, практически не взаимодействуя при этом с суммарным клеточным белком *E. coli*. Это делает возможным использование полученных МКАТ для иммуноскрининга штаммов — продуцентов геино-нижеперного ФНО, а также для идентификации продуктов экспрессии гена ФНО методом иммуноблоттинга. Моноклональные антитела, продуцируемые гибридомами E7H2 и A3E9, позволяют определять в Western-блотте менее 0,1 мкг фактора некроза опухоли, нанесенные на одну дорожку ПААГ шириной 5 мм. На рис. 3 показан анализ методом белкового иммуноблоттинга штаммов *E. coli* SG20050, содержащих описанные в этой работе плазмиды. Хорошо видно, что частично очищенный препарат ФНО, а также лизаты клеток, содержащих плазмиды pTNF183, pTNF1 и pN9 (дорожки 1, 5, 4 и 3 соответственно), четко взаимодействуют с антителами против ФНО, в то время как в случае лизата клеток,

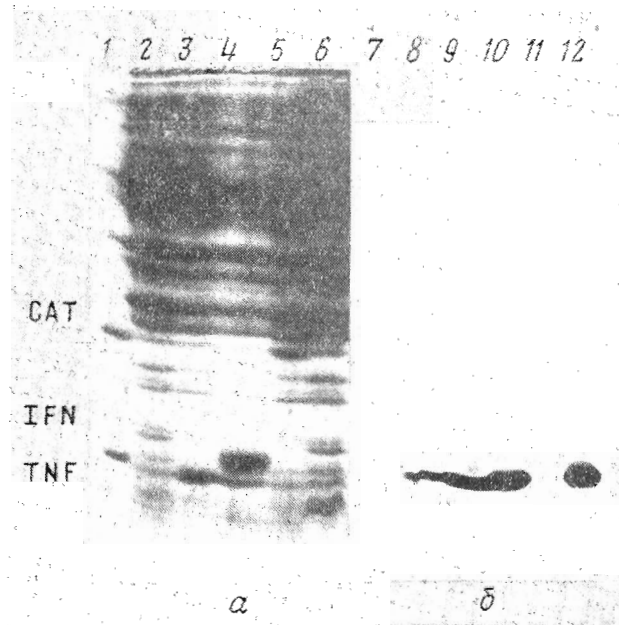


Рис. 3. Электрофорез (а) и иммуноблот (б) с моноклональными антителами, продуцируемыми гибридомой Е7Н2, частично очищенного фактора некроза опухоли (1, 12) и лизатов *E. coli* SC20050 без плазмиды (2 и 11) и с плазмидами рN9, рTNF1, рTNF183 и рTNF2 (3 и 10, 4 и 9, 5 и 8, 6 и 7 соответственно). CAT — хлорамфениколацетилтрансфераза, IFN — α 2-интерферон, TNF — фактор некроза опухоли

не содержащих плазмиду, или в случае клеток с плазмидой рTNF2, кодирующей биосинтез химерного белка β -галактозидаза-ФНО, такое взаимодействие отсутствует. Это, по всей видимости, свидетельствует о том, что использованные в иммуноблоттинге МКАТ (Е7Н2) скорее всего обладают специфичностью к N-концевой части белковой молекулы.

Таким образом, сконструировано несколько вариантов рекомбинантных плазмид, кодирующих полипептид 3–157 фактора некроза опухолей человека. Показано, что полученные плазмиды обеспечивают достаточно высокий уровень биосинтеза ФНО. Рекомбинантный фактор некроза опухолей был использован для получения гибридом, продуцирующих моноклональные антитела против ФНО. Выделены и охарактеризованы три гибридомы, продуцирующие высокоаффинные МКАТ, которые могут быть использованы для иммуноанализа фактора некроза опухоли человека.

Авторы выражают благодарность С. А. Недоспасову, А. Н. Шахову и Р. Л. Турецкой (Институт молекулярной биологии АН СССР, Москва) за помощь при определении биологической активности ФНО, а также за интерес и внимание к работе. Авторы благодарят С. Х. Дегтярева (СКТБ БАВ Минмедбиопрома СССР) за рестрикционную эндонуклеазу *NcoI*.

Экспериментальная часть

Общие сведения об эксперименте см. [22]. В работе использовали dNTP фирмы Р-Л Biochemicals, [γ - 32 P]rATP, [α - 32 P]dATP и [α - 32 P]dGTP фирмы Amersham; рестрикционные эндонуклеазы *EcoRI*, *BamI*, *HindIII* (НИО «Фермент», Вильнюс). Эндонуклеаза *NcoI* получена от С. Х. Дегтярева (НИКТИ БАВ, Бердск). 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактопиранозид (X-Gal) и изопропаноло- β -D-галактопиранозид (IPTG) фирмы Sigma (США). Остальные ферменты выделяли как описано в литературе с небольшими изменениями: *HaeIII*, *SspI* и *SalI* — по методу [23], ДНК-лигазу и T4-полинуклеотидкиназу — модифицированным способом [24], ДНК-полимеразу (фрагмент Кленова) получали из штамма суперпродуцента модифицированным способом [25].

Синтез олигонуклеотидов был выполнен твердофазным методом с наращиванием олигонуклеотидной цепи в направлении от 3'-конца к 5'-концу с помощью защищенных фосфорамидитов — 5'-диметокситрипта-N-ацил-2'-дезоксинуклеозид-3'-O-(метокси-дизопропиламино)-фосфинов, активированных тетразолом. Синтез проводили в стеклянной колонке с пористым фильтром путем ручного прибавления реагентов и растворителей, используя для этой цели 0,6–0,8 мкмоль 3'-концевого нуклеозида, ковалентно связанного с 25–30 мг пористого стекла (размер пор 500 Å). Каждый цикл наращивания проводили как описано в работе [11] с тем лишь отличием, что на стадии копирования в качестве нуклеофильного катализатора использовали N-метилпиперазин. После завершения синтеза отделение олигонуклеотида от носителя и удаление защитных групп проводили действием конц. аммиака (24 ч при 55°С) и синтезированные олигонуклеотиды очищали хроматографией на колонке Zorbax ODS в градиенте концентрации ацетонитрила (15–30%) в 0,05 М ТЕАА. Окончательную очистку олигонуклеотидов проводили на той же колонке после удаления диметокситриптической группы в градиенте концентрации CH₃CN (5–15%) в 0,05 М ТЕАА. Выход очищенного олигонуклеотида 20–80 нмоль.

Лигазная сшивка олигонуклеотидов. Смесь 480 пмоль олигонуклеотида I, 400 пмоль каждого из фосфорилированных олигонуклеотидов II–V и 480 пмоль фосфорилированного олигонуклеотида VI нагревали 10 мин при 65°С в 100 мкл буфера, содержащего 20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 10 мМ MgCl₂, затем медленно охлаждали до 13°С, прибавляли rATP до концентрации 0,2 мМ, дитиотреит до концентрации 5 мМ и 300 ед. T4-DНК-лигазы. Смесь инкубировали 6 ч при 13°С, затем депротеинизировали двукратной экстракцией фенолом. ДНК осаждали этанолом и продукты сшивки выделяли при помощи препаративного электрофореза в 20% ПААГ, содержащего 7 М мочевины. Нужной величины фрагменты ДНК элюировали из геля электроотсосом на DEAE-бумагу (DE-81), которую промывали несколько раз TE-буфером. Нуклеотидный материал элюировали с DEAE-бумаги 1,5 М раствором NaCl в TE-буфере и обессоливали на колонке с сефадексом G-50. Выход сегмента А 280 пмоль. Аналогичным образом получали сегменты В и С. Выходы 350 и 320 пмоль соответственно. Далее сшивали по 50 пмоль сегментов А, В и С в 20 мкл лигазного буфера в течение 4 ч при 15°С. Продукт сшивки выделяли электрофорезом в 15% ПААГ как описано выше. Выход продукта сшивки 35 пмоль.

Клонирование и анализ клонов гибридизацией с олигонуклеотидными зондами проводили как описано в работе [26].

Определение продуктивности штаммов E. coli — продуцентов фактора некроза опухоли человека. Клетки *E. coli* SG 20050, содержащие плазмиды с геном фактора некроза опухоли человека, выращивали при 37°С в 20 мл LB-бульона, содержащего 75 мкг/мл ампициллина, в течение 24 ч на качалке при скорости вращения 190 об/мин. Отбирали пробу 1 мл, центрифугировали 2 мин при 10 000 об/мин (Erpendorf, ФРГ), осадок суспендировали в 60 мкл буфера для ланесения [13], нагревали 10 мин при 95°С и пробы по 5 мкл наносили на 13,5% ПААГ для белкового электрофореза. Другую пробу (2 мл) после центрифугирования (10 мин при 6000 об/мин) суспендировали в 3 мл буфера, содержащего 25 мМ трис-HCl (pH 8,0), 0,5 мМ фецилметилсульфонилфторид и 3 мг/мл лизоцима. Смесь инкубировали 30 мин при 25°С, после чего клетки вскрывали трехкратным повторением операции замораживания в течение 10 мин при –70°С и оттаивания во льду. Содержание фактора некроза опухоли в растворе определяли измерением его биологической активности по методу [27].

Выделение моноклональных антител из культуральной жидкости или асцита проводили сначала осаждением сульфатом аммония (40% от насыщения). Осадок отделяли центрифугированием, растворяли в небольшом объеме воды, диализовали против забуференного физиологического раствора и наносили на колонку с иммобилизованным фактором некроза опухоли (ФНО иммобилизовали на бромцансефарозе 4В по стандартной методике [28]). Элюцию антител проводили с помощью трис-глицинового буфера, pH 2,8. Чистоту полученных антител проверяли электрофорезом в SDS-ПААГ.

Иммуоблоттинг. После проведения электрофореза как описано выше переносили белки на нитроцеллюлозный фильтр в приборе для полусухого электрооблоттинга (Amcos, Дания) при 25°С в течение 1 ч при 0,8 мА/см. После переноса фильтр помещали в раствор 0,1% сывороточного альбумина быка (BSA) в буфере TBS (20 мМ трис-HCl, pH 7,5, 0,5 М NaCl) и выдерживали 16 ч при 4°С, затем отмывали в том же буфере, содержащем 0,05% Твин 20 (TTBS), после чего инкубировали в растворе, содержащем МКАТ (50 мкг/мл), в течение 4–6 ч при 20°С. После этого фильтр тщательно отмывали раствором TTBS и переносили в раствор конъюгата кроличьих антимышиных антител с пероксидазой хрена в TBS, содержащий 0,1% BSA. Через 16 ч при 4°С после тщательной отмывки фильтр помещали для прокрашивания при 4°С на 1–2 мин в 0,06% растворе хлорнафта в TBS, содержащего 20% метанола и 0,06% перекиси водорода.

ЛИТЕРАТУРА

1. Haranaka K., Satomi N., Sakurai A. // Int. J. Cancer. 1984. V. 34. № 2. P. 263–267.
2. Chroboczek-Kelker H., Oppenheim J., Stone-Wolff D., Henriksen de Stejano D., Agarwal B. B., Stevenson H. C., Vilcek J. // Int. J. Cancer. 1985. V. 36. № 1. P. 69–73.
3. Nedwin G. E., Sverdetski L. P., Bringman T. S., Palladino M. A., Jr., Goeddel D. V. // J. Immunol. 1985. V. 135. № 4. P. 2492–2497.

4. Ruff M. R., Gifford G. E. // *Limphokines*. V. 2/Ed. Rick E. N. Y.: Acad. Press, 1981. P. 235.
5. Old L. J. // *Science*. 1985. V. 230. № 4726. P. 630—632.
6. Sugarman B. J., Aggarwal B. B., Hass P. E., Figari J. S., Palladino M. A., Jr., Shepard H. M. // *Science*. 1985. V. 230. № 4728. P. 943—945.
7. Недоспасов С. А., Шахов А. Н., Турецкая Р. Л., Метт В. А., Георгиев Г. И., Добрынин В. Н., Коробко В. Г. // Докл. АН СССР. 1985. Т. 285. № 6. С. 1487—1490.
8. Nedospasov S. A., Shakhov A. N., Turetskaya R. L., Mett V. A., Azizov M. M., Georgiev G. P., Korobko V. G., Dobrynin V. N., Filippov S. A., Bystrov N. S., Boldyreva E. F., Chuvpilo S. A., Chumakov A. M., Shingarova L. N., Ovchinnikov Yu. A. // Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 1986. V. LI. P. 611—624.
9. Pennica D., Nedwin G. E., Hayflick J. S., Seeburg P. H., Derynck R., Palladino M. A., Kohr W. J., Aggarwal B. B., Goeddel D. V. // *Nature*. 1984. V. 312. № 5996. P. 724—729.
10. Shirai T., Yamaguchi H., Ito H., Todd C. V., Wallace R. B. // *Nature*. 1985. V. 313. № 6005. P. 803—806.
11. Atkinson T., Smith M. // *Oligonucleotide synthesis, a practical approach*/Ed. Gait M. J. Oxford: IRL Press, 1984. P. 35—81.
12. Чупило С. А., Кравченко В. В. // *Биоорган. химия*. 1983. Т. 9. № 12. С. 1634—1637.
13. Laemmli U. K. // *Nature*. 1970. V. 227. № 5229. P. 680—685.
14. Гилева И. П., Музенко Г. А., Серпинский О. И., Аммосов А. Д., Кравченко В. В. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 288. № 3. С. 734—737.
15. Martenout A., Fransen L., Tavernier J., Van der Heyden J., Tizard R., Kawashima E., Shaw A., Johnson M.-J., Semon D., Muller R., Ruyschaert M.-R., Van Vliet A., Fiers W. // *Eur. J. Biochem.* 1985. V. 152. № 3. P. 515—522.
16. Aggarwal B. B., Kohr W. J., Hass P. E., Moffat B., Spencer S. A., Henzel W. J., Bringman T. S., Nedwin G. E., Goeddel D., Harkins R. N. // *J. Biol. Chem.* 1985. V. 260. № 4. P. 2345—2354.
17. Edman J. C., Hallelwell R. A., Valenzuela P., Goodman H. M., Ruther W. J. // *Nature*. 1981. V. 291. № 5815. P. 503—506.
18. Windass J. D., Newton C. R., De Maeyer-Guignard J., Moore V. E., Markham A. F., Edge M. D. // *Nucl. Acids Res.* 1982. V. 10. № 21. P. 6639—6657.
19. Кравченко В. В., Гилева И. П., Шагин В. В., Куличков В. А., Добрынин В. Н., Филиппов С. А., Чупило С. А., Коробко В. Г. // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. № 9. С. 1176—1185.
20. Gurvich A. E., Korukova A. // *J. Immunol. Methods*. 1986. V. 87. № 1. P. 161—167.
21. Koehler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. № 5516. P. 498—501.
22. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Быстров Н. С., Колосов М. Н. // *Биоорган. химия*. 1982. Т. 8. № 6. С. 830—839.
23. Green P. J., Heuneker H. L., Bolivar F., Rodrigues R. L., Bellach M. C., Covarrubias A. A., Backman K., Russel D. J., Tait R., Boyer H. W. // *Nucl. Acids Res.* 1987. V. 5. № 7. P. 2373—2380.
24. Dolganov G. M., Chestukhin A. M., Shemyakin M. F. // *Eur. J. Biochem.* 1981. V. 114. № 2. P. 247—254.
25. Klenow H., Henning L. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1970. V. 65. № 1. P. 168—171.
26. Коробко В. Г., Добрынин В. Н., Северцова И. В., Болдырева Е. Ф., Шингарова Л. Н., Чупило С. А., Филиппова Л. Ю., Звонок Н. М., Васильева Т. Е., Колосов М. Н. // *Биоорган. химия*. 1987. Т. 13. № 1. С. 69—81.
27. Liang C.-M., Liang S.-M., Jost T., Sand A., Douglas I., Allet B. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1986. V. 137. № 2. P. 847—854.
28. *Affinity Chromatography. Principle and Methods*. Pharmacia Fine Chemicals. 1979. P. 8—15.

Поступила в редакцию 5.IV.1988.

EXPRESSION IN *ESCHERICHIA COLI* OF ARTIFICIAL DNA CODING FOR HUMAN TUMOR NECROSIS FACTOR

DOBRYNIN V. N., BERKOVA N. P., BOLDYREVA E. F., BYSTROV N. S.,
KRAVCHENKO V. V., FILIPPOV S. A., CHUVPILLO S. A., SHAMBORANT O. G.,
KOROBKO V. G.

*M. M. Shemyakin Institute of Bioorganic Chemistry,
Academy of Sciences of the USSR, Moscow*

The variants of expression in *Escherichia coli* of artificial DNA coding for human tumor necrosis factor, an important immune modulator with selective cytotoxic action on a number of transformed cell lines have been described. The DNA was placed under control of either phage M13 promoter of gene for main coat protein or tandem of pair of *E. coli* tryptophane promoters. It has been shown that *E. coli* cells harbouring plasmids described with artificial TNF gene provide good level of protein biosynthesis. The protein has been purified by anionexchange chromatography near to homogeneity and used for preparation of monoclonals. As result three hybridomas effectively produced high affinity monoclonal anti-TNF antibodies have been obtained and characterized.