
Octrooiraad



Nederland

⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8100558**

⑲ NL

- ⑤4 **Recombinant DNA-techniek voor de bereiding van een op menselijk interferon lijkend eiwit; gen voor de expressie van een dergelijk eiwit; subeenheid van een dergelijk gen; werkwijze voor de bereiding van een dergelijk gen of een dergelijke subeenheid; plasmiderecombinant; werkwijze voor de bereiding daarvan; cel met daarin een dergelijk gen, subeenheid daarvan of plasmiderecombinant; werkwijze voor de bereiding van een dergelijke cel; werkwijze voor de bereiding van een eiwit; aldus bereid eiwit.**
- ⑤1 Int.Cl³.: C12N 15/00, A61K 45/02, C07H 21/04.
- ⑦1 Aanvrager: G.D. Searle & Co. te Skokie, Illinois, Ver. St. v. Am.
- ⑦4 Gem.: Ir. H.M. Urbanus c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

-
- ②1 Aanvraag Nr. 8100558.
- ②2 Ingediend 5 februari 1981.
- ③2 Voorrang vanaf 6 februari 1980, 28 februari 1980, 17 april 1980, 24 april 1980, 12 mei 1980, 18 november 1980.
- ③3 Land van voorrang: Groot-Brittannië (GB).
- ③1 Nummers van de voorrangsaanvragen: 8003947 , 8006712 , 8012666 , 8013592 , 8015646 , 8036951 .
- ⑥2 - -

-
- ④3 Ter inzage gelegd 1 september 1981.

De aan dit blad gehechte afdruk van de beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en) bevat afwijkingen ten opzichte van de oorspronkelijk ingediende stukken; deze laatste kunnen bij de Octrooiraad op verzoek worden ingezien.

Recombinant DNA-techniek voor de bereiding van een op menselijk interferon lijkend eiwit; gen voor de expressie van een dergelijk eiwit; subeenheid van een dergelijk gen; werkwijze voor de bereiding van een dergelijk gen of een dergelijke subeenheid; plasmiderecombinant; werkwijze voor de bereiding daarvan; cel met daarin een dergelijk gen, subeenheid daarvan of plasmiderecombinant; werkwijze voor de bereiding van een dergelijke cel; werkwijze voor de bereiding van een eiwit; aldus bereid eiwit.

De uitvinding heeft betrekking op een recombinant DNA-techniek voor de bereiding van een op menselijk interferon lijkend eiwit.

Interferon is een natuurlijk molecuul, dat bereid wordt door
 5 cellen in responsie op een virusinfectie en bepaalde andere prikkels (zie b.v. Isaacs, A., en Lindenmann, J., Proc. Roy. Soc. B., (1957), 147, 258 - 267).

Wanneer dit molecuul aan cellen wordt blootgesteld, maakt
 het de cellen resistent tegen virusinfectie. Interferon is derhalve een bekend anti-virusmiddel (zie b.v. Isaacs, A. et al., (1957),
 10 Proc. Roy. Soc. B., 147, 268 - 273).

Sedert de aanvankelijke waarneming van de anti-virusactiviteit, zijn een aantal andere eigenschappen aan interferon toegeschreven (zie b.v. Stewart, W.E., II, Interferon I, (1979), Academic Press, I. Gresser (Ed.)), waaronder een mogelijke rol bij het remmen van groei van kankercellen in vivo (zie b.v. Paucker, K., et al., (1962), Virology, 7, 324 - 334; Gresser, I., et al., (1970) Ann. N.Y. Acad. Sci., 173, 694 - 699; Mellstedt, H., et al., (1979), Lancet, 1, 245 - 247; Slomgren, H., et al., (1976), Acta Med. Scand., 199, 527 - 532; Merigan, T.C., et al., (1978), New Engl. J. Med., 298, 961 - 967; en Merigan, T.C. et al., (1978),
 15 New Engl. J. Med. 299, 1449 - 1453).

Interferon vertoont ook een opmerkelijke mate van speciës-

specificiteit (zie b.v. Tyrell, D.A.J., (1959), Nature, 184, 452 - 453, en Gresser, I., et al., (1974), Nature, 251, 543 - 545), hetwelk betekent dat voor de behandeling van een menselijke ziekte, de voorkeur wordt gegeven aan interferon dat van menselijke cellen is afgeleid.

Voor een gedetailleerd overzicht met betrekking tot interferon wordt verwezen naar Texas Reports on Biology and Medicine, 35, 1979, gepubliceerd bij de University of Texas Medical Branch, Galveston, Texas, U.S.A., (S. Baron en F. Diazani, Editors).

Wat conventionele bronnen betreft, zijn weefselcultuurcellen de enige praktische bron voor materiaal. Een op weefselcultuurcellen gebaseerde werkwijze wordt beschouwd arbeidsintensief, onbetrouwbaar en kostbaar te zijn en leidt in het algemeen tot lage opbrengsten.

Doel van de uitvinding is om middelen te verschaffen voor de bereiding van een eiwit met eiwitten die lijken op menselijk interferon, door recombinant DNA-technieken in bacteriën, welke middelen goedkoper en betrouwbaarder zijn en ook de mogelijkheid bieden om gemodificeerde vormen van interferon te bereiden. Voorts kunnen hogere opbrengsten worden verkregen.

Interferon is een glycoproteïne met een molecuulgewicht van ongeveer 20.000. De amino-eindstandige polypeptideopvolgingen van menselijke en muizen-interferons zijn bekend (zie b.v. Knight, E., Jr., et al., (1980), Science 207, 525 - 526; Zoon, K.C., et al., (1980), Science, 207, 527; en Taira, H., et al., (1980), Science, 207, 528 - 529).

Fig.1 toont gekozen gebieden van deze opvolgingen, samen met de overeenkomstige codonmogelijkheden. Van de 13 aminozuren die bekend zijn voor menselijk fibroblast FS-4 interferon, zijn er drie gemeenschappelijk (onderstreept) met de muis-interferons A en B, verkregen van Ehrlich ascites tumorcellen, terwijl slechts één aminozuur gemeenschappelijk is tussen menselijk fibroblast en lymfoblastoïde interferons. Op het DNA-niveau schijnt inderdaad overeenstemming tussen menselijk fibroblast interferon en muis-interferons A en B (met stippen aangegeven) waarschijnlijker te zijn dan tus-

sen twee menselijke eiwitten.

Het met de vijf amino-eindstandige resten van menselijk fibroblast interferon overeenstemmende gebied toont duidelijk een minimaal aantal permutaties van coderend oligonucleotide over een opvolging van voldoende lengte om redelijk specifiek te zijn voor een individueel mRNA in een hogere eukaryotecel (zie b.v. Montgomery, D.L., et al., (1978), Cell, 14, 673 - 680). De codons voor de serine- en leucineresten worden gededuceerd door eerst die tripletten te kiezen die het meest waarschijnlijk een maximale homologie met de analoge muiscodons vertoonden. De nu in deze en de andere tripletten resterende onzekerheden werden vervolgens verder verminderd door te werken op bekende frequenties van codongebruik in menselijke genen (zie b.v. Grantham, R., et al., (1980), Nucl. Acids Res., 8, r47 - r62). Het was derhalve mogelijk om het aantal mogelijke coderingsvolgingen te verminderen tot twee, waarbij het enige verschil lag in de derde rest van het serinecodon, welke in deze positie geen duidelijk onderscheid vertoonde. Op deze basis werden de opvolgingen van twee oligodeoxyribonucleotiden (IFIA en IB) gededuceerd, waarvan verwacht werd dat ze specifiek de synthese op gang brachten van interferon cDNA, indien geïncubeerd met omgekeerd transcriptase en polyA-mRNA (3'-eindstandig polyadenyleerd mRNA), geëxtraheerd van "geïnduceerde" cellen.

Een extra factor bij de voorspelling van de structuur van interferon mRNA-specifieke primers was de aanname dat een G-rest in DNA een matig stabiel basepaar kan vormen met een U-rest in RNA (of een T-rest in DNA). Wanneer de primers dus op bepaalde posities een G-rest bevatten in plaats van de correcte A-rest, zou toch een mate van specifiek op gang brengen verwacht kunnen worden (zie b.v. Powers, G.J., et al., (1975), J.A.C.S., 97, 875 - 884).

De oligonucleotiden (IFIA en IB) werden gesynthetiseerd en radioactief gelabeld met ³²P-fosfaat op de 5'-eindpunten daarvan, gehybridiseerd tot mRNA-preparaten waaruit menselijke fibroblasts, hetzij "quasi-geïnduceerd" (Engels: "mock induced") hetzij geïnduceerd tot de produktie van interferon door op gang te brengen (Engels: "priming") met interferon en daaropvolgende superinductie

onder toepassing van poly(I) : poly(C) en cycloheximide, en geïncubeerd met het enzym omgekeerd transcriptase met de conventionele deoxynucleosidetrifosfaatsubstraten. Alleen IFIA gaf een transcript van ongeveer 150 nucleotiden, specifiek voor mRNA van geïnduceerde fibroblasts. De nucleotideopvolging van deze negatieve streng transcript werd bepaald volgens bekende methoden en wordt in fig.2

5

getoond. De bovenstreng in fig.2 is de opvolging van het DNA-transcript. Deze DNA-opvolging definieert de volgorde van het 5'-einde van het menselijke fibroblast interferon mRNA, getoond als de benedenstreng in fig.2. De mRNA-opvolging definieert op zijn beurt de eiwitopvolging, beginnende bij het eerste AUG, van het aminoeindstandige gebied van het veronderstelde interferonvoorlopermolecuul.

10

Een tweede oligodeoxynucleotide (IFII) werd gesynthetiseerd, dat complementair was aan een deel van de bepaalde opvolging zoals in fig.3 is getoond. $\angle^{32}\text{P}\angle$ IFII werd gehybridiseerd zoals boven tot cDNA, bereid volgens bekende procedures uit totaal mRNA van geïnduceerde en quasi-geïnduceerde fibroblastcellen en een als boven geproduceerd transcript. Wanneer de produkten van deze reactie gefractioneerd werden op basis van afmetingen onder toepassing van denaturerende gelelektroforese, werd een bijzonder radioactief transcript van ongeveer 700 nucleotiden verkregen uit cDNA van geïnduceerde, maar niet quasi-geïnduceerde cellen.

15

20

Na elektroforese door natieve gellen, had het interferon specifieke produkt een lengte van ongeveer 850 baseparen, hetwelk ongeveer overeenkomt met de grootte van het complete interferon mRNA-molecuul. Dit verschil in grootte kan worden verklaard door aan te nemen dat het enkelstrengs interferon cDNA, zoals het ook werkt als templaar voor IFII, ook zelf op gang brengt dank zij het terug op zichzelf vormen van een lus van het 3'-einde. Dit transcript wordt vervolgens verlengd tot aan de positie van het IFII-op gang gebrachte transcript waar het een halt wordt toegeroepen, waardoor een dubbelstrengs interferongen van de volledige lengte wordt verkregen (d.w.z. een gen dat codeert voor interferon), waar-

25

30

35

in het 3'-einde van het zelf op gang gebrachte transcript en het 5'-einde van het door IFII op gang gebrachte transcript niet covalent gebonden zijn. De grootte van het interferon specifieke product zal derhalve variëren met het type gelsysteem.

5 Het interferongen werd geëluëerd uit natieve gels en gevolgd door bekende methoden die leiden tot opheldering van de gen-opvolgingscodering voor het amino-eindpunt van het rijpe fibroblast-interferon. Een uitgebreide versie van IFII, IFIII (zie fig.4) werd eveneens bereid en de bovenstaande werkwijze herhaald. Dezelf-
10 de resultaten werden verkregen.

Deze opvolging verifieert grotendeels de bij de synthese van IFIA gebruikte voorspellingen. Uit een vergelijking van de fig. 1 en 5 kan worden gezien, dat de feitelijke mRNA-opvolging die het amino-eindpunt van het rijpe interferonpolypeptide specificeert,
15 identiek is aan die waarop de structuur van IFIA was gebaseerd, afgezien van slechts één nucleotideverschil in het codon voor het vijfde aminozuur van het amino-eindpunt van het rijpe polypeptide. Derhalve werden uit een totaal van zeven twijfelachtige nucleotideposities, er zes correct geanticipeerd in het geval van IFIA.
20 (Zie b.v. Houghton, M., et al., (1980), Nucl. Acids Res. 8, 1913 - 1931.)

Vervolgens werd een extra oligodeoxynucleotide primer, IFIV (zie fig.4) bereid dat overeenstemde met een gebied nabij het uiteinde van de vers bepaalde opvolging. Door bovenstaande werkwijze
25 te herhalen, werd verdere informatie over de opvolging verkregen waaruit een ander primer, IFV (zie fig.4) werd gededuceerd en gesynthetiseerd. De werkwijze werd vervolgens opnieuw herhaald. Op deze wijze werd de gehele gen-opvolgingscodering voor het rijpe fibroblast interferon polypeptide (zie fig.5) stapsgewijze vastge-
30 steld. (Zie b.v. Houghton, M., et al., (1980), Nucl. Acids Res. 8, 2885 - 2894.)

In fig.6 is de dubbelstrengs gen-opvolging weergegeven, die codeert voor de 5'-niet vertaalde mRNA-opvolging en de eiwitcoderende mRNA-opvolging.

35 Een illustratief schema van de basisprocedures, gebruikt

voor het clonen van het interferongen tot bacteriële plasmiden, is in fig.7 weergegeven.

De eindprodukten van deze procedures waren recombinanten, die interferon-genen bevatten die codeerden voor het rijpe interferonpolypeptide en de 3'-niet vertaalde interferon mRNA-opvolging. Bovendien bevatten deze recombinanten 1 molecuul van IFIII primer dat voorafging aan de rijpe interferon-gen opvolging en ook een synthetisch Hind III schakelmolecuul aan beide einden van het gen.

Een partiële DNA-nucleotideopvolging van een van deze interferon-gen recombinanten wordt getoond in fig.8, welke laat zien dat tijdens de cloningsprocedures (waarschijnlijk als gevolg van de S1 nucleasebehandeling), het 5'-eindstandige nucleotide van IFIII verloren ging. Ook werd waargenomen dat de mRNA-tripletcodering voor de tyrosinerest op de aminozuurpositie 30 in het rijpe eiwit UAU was, in plaats van het UAC-triplet dat eerder vastgesteld werd door directe opvolging van omgekeerde transcripts (zie fig.5). Deze "stille" nucleotidewijziging is waarschijnlijk een gevolg van gen-polymorfisme en betekent dat beide typen genen tot de expressie van identieke interferons zullen leiden.

Teneinde het interferon-gen te exprimeren in bacteriën, werd het overgebracht van pBR 322 (zie b.v. Bolivar, F., et al., (1977), Gene, 2, 95 - 113) in de Hind III plaats van de zogenaamde pWT 2x1 expressieplasmiden. De laatstgenoemde reeks van plasmiden bevat de promotoropvolging, die verantwoordelijk is voor de transcriptie van het tryptofaanoperon en zorgen voor alle drie de mogelijke vertalingsfasen (zie b.v. de gepubliceerde Britse octrooiaanvraag 2.052.516). Indien het interferon-gen derhalve in deze plasmiden in de correctie oriëntatie ten opzichte van de transcriptie wordt ingebracht, zal slechts één leiden tot de betrouwbare expressie van het gen. Uit de in fig.8 weergegeven opvolging werd voorspeld dat pWT 221 de "open" vertalingsfase zou verschaffen die nodig is voor de betrouwbare expressie van het rijpe interferon polypeptide, hoewel laatstgenoemde zou worden verbonden met een amino-eindstandig peptide van 16 resten, resulterend van de expressie van de korte trp E gen opvolging en de in de pWT 2x1 plasmiden aanwezige Hind

III schakelmoleculen en ook van de expressie van de Hind III schakel en de IFIII primer, gebruikt bij de aanvankelijke cloning van het interferon-gen. Wanneer het interferon-gen werd overgebracht naar de pWT 2x1 plasmiden en de trp-promotor tot derepressie werd
5 gebracht door incubatie bij afwezigheid van tryptofaan en bij aanwezigheid van 3/ β -indoolacrylzuur, werd inderdaad alleen antivirale activiteit aangetoond in het geval van het pWT 221 derivaat, zoals verwacht.

Fig.9 (waarin Veros = controlecellen, niet geïnfecteerd met EMC-virus (Encephalomyocarditis virus); Std. A = interferon standaard A; Std. B = interferon standaard B; 221 = extract van recombinant, bevattende het in pWT 221 ingebrachte interferon-gen; 231 =
10 extract van recombinant, bevattende het in pWT 231 ingebrachte interferon-gen; 231 + Std. B = extract van recombinant, bevattende het interferon-gen, ingebracht in pWT 231 waaraan vóór de extractie interferon standaard B was toegevoegd; en EMC = controlecellen, geïnfecteerd met EMC-virus), toont een typerend resultaat, verkregen wanneer de bacterie-extracten worden geanalyseerd op antivirale
15 activiteit in een in vitro systeem. In dit systeem werden de monsters in 0,5 log₁₀ stappen verdund en aangebracht op monolagen van African green monkey cellen (Veros). Na een incubatie gedurende een nacht, werden de cellen op de proef gesteld met EMC-virus voordat de cellen werden gekleurd, waarbij de monsters die interferonactiviteit bevatten, de verocellen bleken te beschermen tegen het cytopathische effect (cpe) van het virus. Door de verkregen resultaten
20 te vergelijken met bekende interferonstandaards, kon het activiteitsniveau kwantitatief worden vastgesteld.

Geen activiteit werd waargenomen in extracten van de pWT 211 of pWT 231 interferonrecombinanten (slechts het resultaat verkregen met de pWT 231 recombinant wordt in fig.9 getoond), terwijl de
30 waargenomen activiteit van extracten van pWT 221 recombinanten equivalent is aan een opbrengst van ongeveer 10⁶ internationale referentie-eenheden van interferon per dm³ bacteriën (d.w.z. equivalent aan 10⁶ eenheden van een internationaal standaardpreparaat van interferon, waarbij één eenheid gedefinieerd is in termen van die
35

hoeveelheid, die leidt tot een 50% vermindering van de virusrepliecatie in weefselcultuur). Het is waarschijnlijk dat een aanzienlijke interferonactiviteit verloren gaat tijdens de extractieprocedure, omdat slechts een opbrengst van ongeveer 30% werd verkregen wanneer een natieve fibroblast interferonstandaard aan de pWT 231 recombinant werd toegevoegd vóór de extractie. (Opgemerkt wordt dat het waargenomen toxische effect van de recombinantextracten in de antivirusanalyses te wijten is aan de aanwezigheid van Triton X-100, dat in dit bijzondere extractieprocedé werd gebruikt.)

Het was nu nodig om de DNA-codering voor de niet interferon aminozuren aan het amino-eindpunt van het verbonden interferonpolypeptide te verwijderen. Dit kan geschikt worden uitgevoerd door gebruik te maken van het plasmide pWT 501 (zie b.v. de Britse octrooi-aanvraag 80 36080).

Het plasmide pWT 501 heeft een molecuullengte van 3805 bp (baseparen) en de restrictiekaart daarvan is in fig.10 getoond.

Dit plasmide kan worden geproduceerd met een werkwijze, waarbij pWT 221 aan restrictie wordt onderworpen onder toepassing van Hha I, het trp-promotor bevattende fragment wordt geïsoleerd, dit fragment wordt geïncubeerd met DNA-polymerase I, het verkregen fragment met stomp einde wordt geligateerd aan Hind III schakels, het geligateerde materiaal onder toepassing van Hind III wordt onderworpen aan restrictie, het trp-promotor bevattende fragment wordt geïsoleerd, dit fragment wordt geligateerd aan Hind III-gesneden, bacteriële basische fosfatase-behandeld pAT 153 (zie b.v. Twigg, A.J., en Sherratt, D., (1980), Nature 283, 216 - 218), E. coli K-12 HB101 wordt getransformeerd (genotype gal⁻, lac⁻, ara⁻, pro⁻, arg⁻, str^R, rec A⁻, r_k⁻, M_k⁻; zie b.v. Boyer, H.W., en Roullard - Dussoix, D., J. Mol. Biol., 41, 459 - 472) waarbij het verkregen plasmide wordt gebruikt en geselecteerd op ampicillinweerstand en tetracyclinweerstand.

Een klein Hind III/Taq I restrictiefragment, dat de trp-promotor bevat, kan uit dit plasmide worden geïsoleerd. De Taq I splitsingsplaats in kwestie bevindt zich in de DNA-opvolging overeenkomend met de ribosoom bindingsplaats in het mRNA-gebied, dat codeert

voor het trp-leiderpolypeptide, dat juist vóór het initiërende methioninetriplet optreedt. Dit fragment kan worden verbonden met een Sac I/Hind III restrictiefragment van het gecloonde interferongen, dat de gehele rijpe eiwit coderende opvolging bevat, vooraf
5 gegaan door slechts zes baseparen zoals in fig.11 is getoond. Aangezien het amino-eindstandige residu van het rijpe interferon methionine blijkt te zijn, kan het verbindingsprocédé worden uitgevoerd op zodanige wijze, dat een chimerisch DNA wordt verkregen dat na transcriptie een kunstmatige ribosoom bindingsplaats bevat die dit
10 methioninecodon als initiërend codon voor vertaling gebruikt. Het samengevoegde molecuul werd vervolgens gecloond tot in E. coli K-12 HB101 onder toepassing van pAT 153 als plasmidevector. Deze werkwijze is in fig.11 weergegeven.

Een ander belangrijk gevolg van de bovenstaande werkwijze
15 is dat het verkregen expressieplasmide het trp-verdunnergebied ontbeert dat een belangrijke rol speelt bij het reguleren van de transcriptie van het trp-operon (zie b.v. Miozzari, G.F., en Yanofsky, C. (1978), J. Bacteriol., 133, 1457 - 1466).

Recombinanten, die het vereiste samengevoegde molecuul in
20 de ene of de andere oriëntatie bevatten, werden vervolgens geanalyseerd op het vermogen daarvan om interferon te produceren. Ze bleken aanzienlijk hogere niveaus te produceren, van ruwweg zesvoudige (in beide oriëntaties) extraheerbare antivirussactiviteit in vergelijking tot de recombinanten, die het in pWT 221 ingebrachte interferongen bevatten. Zoals verwacht was de grootte van het interferonprodukt (ongeveer 19.000 Dalton) kleiner dan die, welke verkregen werd onder toepassing van pWT 221 als expressieplasmide (ongeveer 24.000 dalton). Dit wordt in fig.12 getoond en is redelijk consistent met de verwachte aard van de in beide gevallen geproduceerde interferonpolypeptiden (in fig.12: a = recombinant, dat het samengevoegde molecuul in rechtse oriëntatie bevat (d.w.z. de transcriptie verloopt van de trp-promotor naar het tetracyclineweerstandsgen in het plasmide); b = recombinant, dat het samengevoegde molecuul in linkse oriëntatie bevat (d.w.z. de transcriptie verloopt van de trp-promotor weg van het tetracycline-weerstandsgen); c =
35

transformant, dat pAT 153 alleen bevat; d = recombinant dat het interferon-gen bevat, maar de trp-promotor mist; f = expressie-recombinant, bestaande uit het in pWT 221 ingebrachte interferon-gen; en g = expressierecombinant, bestaande uit het in pWT 211 ingebrachte interferon-gen). Fig.12 toont ook de overvloed aan 19.000 dalton-interferonpolypeptide ten opzichte van het 24.000 dalton-produkt, bereid in de pWT 221 recombinant. Deze toename in expressie van het interferon-gen kan worden toegeschreven aan de verwijdering van het trp-verdunnergebied.

De kunstmatige ribosoom bindingsopvolging bevat zes nucleotiden tussen resten van de Taq I splitsingsplaats en het ATG initiatortocodon. Het oorspronkelijke plasmide (pWT 501) bevat slechts vijf nucleotiden (van verschillende opvolging) in dit analoge gebied (zie fig.11). Daarom kunnen verdere veranderingen in de grootte en opvolging van dit bijzondere gebied in het interferonrecombinant het rendement verhogen van de ribosoom binding en derhalve de opbrengst van het interferonpolypeptide verbeteren.

Te verwachten is dat de opbrengst aan interferonachtig polypeptide verder verbeterd kan worden door het aantal interferongenen en/of trp-promotors in elk plasmide te verhogen. Dit kan volgens bekende methoden worden gerealiseerd.

Ook zal het gebruik van bacteriefermentors, waarin hoge cel-dichtheden kunnen worden verkregen, vanzelfsprekend de opbrengst aan interferonactiviteit per dm³ bacteriën verhogen.

Behalve dat het in staat is tot bescherming van de Vero-cellen tegen het cpe van EMC-virus, beschermt het interferonpolypeptide, dat in bacteriën is geproduceerd, ook V3 African green monkey cellen tegen infectie door vesiculaire stomatitis virus (VSV) in vitro. Bovendien is het bacteriële interferonpolypeptide evenals het natieve fibroblastinterferon ook in staat gebleken tot verhoging van de natuurlijke dodende activiteit van menselijke lymfocieten in vitro.

Het genetisch gebouwde interferonachtige eiwit is primair bedoeld voor gebruik in de behandeling van ziekten en zal worden gebruikt in effectieve hoeveelheden, desgewenst met een farmaceu-

tisch aanvaardbare drager. De in onderzoeken toegepaste doseringen waarbij natieve menselijke interferons werden gebruikt, varieerden aanzienlijk, b.v. van 10^5 tot 10^7 internationale referentie-eenheden per dag voor verschillende perioden (zie b.v. Scott, G.M., en Tyrell, D.A.J., (1980), Brit. Med. J., 280, 1558 - 1562). Het geprefereerde behandelingsregime zal naar verwachting variëren overeenkomstig het type en de ernst van de ziekte. Het uit bacteriën bereide interferonpolypeptide kan in sommige gevallen afwijkende activiteiten en farmacokinetische eigenschappen vertonen in vergelijking met natief fibroblastinterferon.

Het interferonrecombinant DNA is ook gebruikt voor het onderzoeken van menselijke gen-banken op de aanwezigheid van cloons die het chromosomale interferon-gen bevatten. Dit werd gerealiseerd door eerst het Hind III restrictiefragment te extraheren dat het interferon-gen bevatte van het pWT 221 recombinantplasmide, dit van een radiolabel te voorzien en vervolgens te hybridiseren tot plaatjes, bereid door transfectie van bacteriën met een menselijke chromosomale DNA/ λ faag-hybridebibliotheek. De plaatjes die de interferon-gen sonde specifiek bonden, werden gezuiverd en daaruit werd λ -recombinant DNA bereid. Het fibroblast (of β) interferon-gen, aanwezig in deze moleculen, werd vervolgens in opvolging gebracht en de opvolging is weergegeven in fig.13.

Een niet onderbroken gen-opvolging, identiek aan die welke in fig.6 is weergegeven, werd waargenomen, onmiddellijk gevolgd door een opvolging die overeenkomt met de 3' niet vertaalde interferon mRNA-opvolging, die tevoren was bepaald (zie b.v. Taniguchi, T. et al., (1980), Gene, 10, 11 - 15; en Derynck, R. et al., (1980), Nature, 285, 542 - 547).

Deze waarneming laat zien dat er geen tussenkomende opvolgingen (introns) zijn binnen dit bijzondere fibroblastinterferon-gen in het genome.

Bovendien werden ook korte gen-opvolgingen stroomopwaarts van en stroomafwaarts van het interferon-gen vastgesteld. Het stroomopwaarts flankerende gebied kan deel uitmaken van de RNA-polymerase-initiatie/promotoropvolging die de transcriptie van het interferon-gen in menselijke fibroblasts controleert (zie b.v.

Houghton, M., et al. (1981), Nucl. Acids Res. 9, No.2).

Het blijkt dat bacteriën niet betrouwbaar eukaryote genen die introns bevatten kunnen exprimeren en dus is een implicatie van het bovenstaande dat het mogelijk dient te zijn om bacteriën te induceren voor de produktie van menselijke interferons door ze met chromosomale genen die voor interferon coderen, te transformeren. Deze chromosomale genen zouden kunnen worden geïsoleerd van gemakkelijk beschikbare menselijke gen-banken en een dergelijke benadering heeft voordelen boven het eerst isoleren van het interferon mRNA uit geïnduceerde eukaryote cellen, het synthetiseren van het cDNA-gen in vitro, het transformeren van bacteriën enz. Aangezien het blijkt, dat interferon-genen in het algemeen geen introns bevatten, omdat een leukocyt interferon-gen ze ook mist (zie b.v. Nagata, S., et al., (1980), Nature 287, 401 - 408), zou een dergelijke benadering op verschillende interferon-genen kunnen worden toegepast.

Door het gecloonde interferon-gen te gebruiken, d.w.z. cDNA-gen, als sonde voor homologe opvolgingen in totaal genomisch DNA, tot restrictie gebracht met een verscheidenheid aan restrictie-enzymen, kon de aanwezigheid van één overheersend type fibroblastinterferon-gen worden waargenomen (zie b.v. Houghton, M., et al., loc cit). Er was echter enig bewijs voor de aanwezigheid van andere genen die partieel homoloog waren aan de sonde (ibid). De mogelijkheid blijft derhalve bestaan dat andere interferon-genen zouden kunnen worden geïsoleerd (uit restrictieontsluitingen van totaal genomisch DNA of direct uit menselijke chromosomale gen-banken) onder toepassing van het onderhavige bijzondere gecloonde interferon-gen. Verder is het nu doenlijk, nu specifieke oligonucleotiden met succes gebruikt zijn voor het detecteren van bacteriële recombinanten die interferon-genen bevatten (zie 11 onderstaand), om geselecteerde oligonucleotiden te gebruiken voor de detectie en isolering van verschillende interferon-genen die aanwezig zijn in menselijke chromosomale gen-banken of aanwezig zijn in een restrictieontsluiting van totaal genomisch DNA. De onderhavige interferon-gen opvolging toont b.v. bepaalde overeenkomsten met

menselijke leukocyte genen (zie b.v. Taniguchi, t., et al., (1980), Nature, 285, 547; en Streuli, M., et al. (1980), Science, 209, 1343 - 1347). Door een oligonucleotidesonde te gebruiken die gemeenschappelijk is tussen de fibroblast en leukocyte interferon-gen opvolgingen, is het mogelijk om beide gen-typen uit b.v. een menselijke gen-bank te isoleren. Op soortgelijke wijze zouden andere partieel homologe interferon-genen kunnen worden verkregen door andere oligonucleotiden te gebruiken, die homoloog zijn aan verschillende gebieden van het onderhavige gecloonde interferon-gen. Een dergelijke benadering zou effectiever zijn dan eenvoudig het gehele gecloonde fibroblastinterferon-gen te gebruiken als sonde voor partieel homologe genen, als gevolg van een vermindering van de "achtergrond" in dergelijke experimenten door het gebruik van specifieke oligonucleotiden.

Gemeenschappelijke opvolgingen tussen verschillende interferon-genen wijzen erop dat ze voor een gemeenschappelijke functie kunnen coderen, die door de verschillende interferonpolypeptiden worden vertoond. De gen-opvolgingcodering voor de 50 - 60 aminozuren ongeveer bij het carboxyleindpunt van het molecuul, kan derhalve van bijzondere betekenis zijn en opgemerkt wordt dat het produkt van een recombinant dat een dergelijk sub-gen of een deel daarvan bevat, een bijzondere waarde kan hebben. Zo kunnen ook andere sub-genen (of ze nu enige homologie met andere interferon-gen opvolgingen vertonen of niet) een bijzondere waarde hebben.

Ook wordt opgemerkt, dat de fibroblastinterferon-gen opvolging beperkt kan zijn met betrekking tot expressie in bacteriën als gevolg van het gebruik van codons, die eventueel niet vaak in bacteriële mRNA-moleculen worden gebruikt. Het is derhalve duidelijk dat door bepaalde interferon-gen codons te veranderen, zodat ze nog steeds hetzelfde aminozuur zullen coderen, maar efficiënter door de bacteriële vertalingsapparatuur zullen worden vertaald, de totale opbrengst aan interferon kan worden verbeterd. De logica die een rol speelt bij het beslissen welke codons, indien die er zijn, profijt zouden trekken van een instelling, kan worden gebaseerd op waargenomen codongebruik in prokaryote mRNA-moleculen (zie

b.v. Grantham, R., et al., loc cit.).

Ook werd opgemerkt dat clonen van het interferon-gen dat bovendien het DNA bevat voor de prepeptidesignaalopvolging, tot enig voordeel kan leiden. Het interferonprodukt kan b.v., eventueel na splitsing van de signaalopvolging, worden afgezonderd in de periplasmische ruimte. Bovendien kan de conformatie van het interferonpolypeptide meer lijken op de natuurlijke toestand dan die, die verkregen wordt door directe expressie van de gen-opvolging die co-deert voor het rijpe interferon alleen. Derhalve kan de activiteit van het interferonprodukt groter zijn.

Alternatieve benaderingen voor de produktie van interferon door genetische bouw omvatten de introductie van het vereiste interferon-gen in eukaryote cellen, b.v. muis L-cellen of gistcellen.

Muis L-cellen kunnen met exogeen DNA worden getransformeerd en dit kan met menselijke interferon-genen op een aantal wijzen worden uitgevoerd. B.v. zou een chromosomaal interferon-gen dat de gehele DNA-opvolging bevat, die vereist is voor een correcte RNA-polymerase-initiatie, kunnen worden gecloond in de muiszellen, waardoor aldus transcriptie en daaropvolgende expressie mogelijk worden gemaakt. Anderzijds zou een interferon-gen, dat deze promotoropvolging mist, geschikt verbonden kunnen worden met een ander stuk van eukaryote DNA dat een promotor bevat, b.v. het thymidinekinase-gen dat als basis voor transformantselectie wordt gebruikt (zie b.v. Wigler, M., et al., (1979), Cell, 16, 777 - 785). Op deze wijze zou transcriptie van het interferon-gen via de verbonden gen-opvolging verlopen.

Het is ook mogelijk dat transformatie van L-cellen met een interferon-gen dat een promotoropvolging mist, toch tot expressie van het DNA leidt als gevolg van een toevallige inbrenging in bepaalde gebieden van het genome.

Anderzijds huizen bepaalde plasmiden in gistcellen en zouden interferon-genen in dergelijke plasmiden en geschikt gemodificeerde versies daarvan kunnen worden geïntroduceerd om expressie te verkrijgen van het heterologe DNA en interferonpolypeptide op te leveren.

Het is mogelijk dat volgens dergelijke methoden bereid interferon meer biologisch werkzaam en effectief is dan interferon, bereid in prokaryotes waar bepaalde belangrijke modificaties niet aan het eukaryote eiwit kunnen worden aangebracht. Ook kan de opbrengst
5 aan interferon hoger zijn in deze eukaryote systemen.

Derhalve verschaft de uitvinding in een eerste uitvoeringsvorm een gen voor de expressie van een eiwit met eigenschappen die lijken op die van menselijk interferon, omvattende een coderingsstreng en een complementaire streng, waarvan de coderingsstreng
10 de volgende opvolging bevat:

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.TTC.GAA.-
GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.GTT.CGT.GTT.GTC.-
AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.-
TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.-
15 AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.-
AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.-
GAG.ATT.AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.GAT.TCA.-
TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.-
20 GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.-
GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.-
AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.-
ACT.CAC.TGT.GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.-
TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.-
25 AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.CTT.CAA.CCA.-
GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.GCA.TAT.GAA.AGG.-
ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.-
TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TCA.-
ACA.TGG.CA 3'

30 of een sub-eenheid daarvan of een equivalent daarvan. (Opgemerkt wordt dat de zogenaamde coderingsstreng dezelfde betekenis heeft als het mRNA)

Het bovenstaande correspondeert met de gehele mRNA-coderingsopvolging plus de stroomopwaartse en stroomafwaartse gen-opvolgingen
35 verkregen door isolatie van het gen uit een chromosomale gen-bank

8100558

en in opvolging brengen (Engels: "sequencing").

Volgens een verdere uitvoeringsvorm verschaft de uitvinding een gen, waarvan de coderingsstreng de volgende opvolging bevat:

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.-
5 TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.-
GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.-
GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.-
TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.-
TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.-
10 TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.-
AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.-
GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.-
CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.-
15 GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.-
AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.-
ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.-
20 AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.-
CTT.CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.-
ACT.GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.-
AAA.TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.-
AAT.AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TCA.ACA.TGG.CAG.TTT.TAA.-
25 TTT.CGA.TTT.GAT.TTA.TAT.AAC.CA..3'

of een subeenheid daarvan of een equivalent daarvan.

Dit stemt overeen met het bovenstaande met enige extra stroomafwaartse opvolging.

De uitvinding verschaft ook een gen, waarvan de coderings-
30 streng de volgende opvolging bevat:
5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.-
CCT.TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.-
GAC.ACT.GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.-
CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.-
35 CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.-

AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.-
AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAT.TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.-
TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.-
CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.-
5 CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.-
ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.-
AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.-
GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.-
CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
10 ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.-
GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.-
TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.-
AGA.TCT.CCT.AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.-
TCA.AGC.ATT.CTT.CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.-
15 GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.-
TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.-
TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.-
AAG.TCA.ACA.TGG.CAG.TTT.TAA.TTT.CGA.TTT.GAT.TTA.TAT.-
AAC.CA .. 3'

20 of een subeenheid daarvan.

Dit vormt een polymorfe vorm van het bovenstaande.

Bepaalde bijzondere delen van dergelijke genen vormen eveneens uitvoeringsvormen van de uitvinding.

25 Derhalve verschaft de uitvinding in een bijzondere verdere uitvoeringsvorm een gen, waarvan de coderingsstreng de volgende opvolging bevat:

5' TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.-
CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.-
ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.-
30 TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.-
GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.-
CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.CTC.-
AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.-
CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
35 ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.-

CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.-
 GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.-
 CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.-
 TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.-
 5 AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.-
 GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.-
 ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.-
 TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.-
 GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.CTT.CAA.CCA.GCA.GAT.-
 10 GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.GCA.TAT.GAA.-
 AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.TTA.TGA.-
 GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.AAA.-
 TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TC 3'

of een equivalent daarvan.

15 Eventueel met de toevoeging van een of twee A-resten aan het
 3'-einde vormt dit de gen-opvolging, die overeenstemt met de gehele
 mRNA-opvolging.

In een andere bijzondere uitvoeringsvorm verschaft de uit-
 vinding een gen, waarvan de coderingsstreng de volgende opvolging
 20 bevat:

5' ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.-
 TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.-
 CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.-
 AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.-
 25 CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.-
 AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.-
 ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.-
 AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.-
 GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.-
 30 CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.-
 GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.-
 AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.-
 AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.-
 GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.-
 35 GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA. 3'

of een equivalent daarvan.

Dit stemt overeen met de gen-opvolging, die codeert voor het prepeptide en het rijpe eiwit.

Ook verschaft de uitvinding een gen, waarvan de coderings-
streng de volgende opvolging omvat:

5' ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.-
AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.-
GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.-
GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.-
10 AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.-
AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.-
GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.-
GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.-
GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.-
15 ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.-
CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.-
TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA. 3'
of een equivalent daarvan.

20 Dit stemt overeen met de gen-opvolging, die codeert voor het rijpe eiwit.

Subeenheden van dergelijke genen vormen eveneens uitvoerings-
vormen van de uitvinding.

De uitvinding verschaft ook een werkwijze voor de bereiding
25 van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan
overeenkomstig een van de eerste drie bovenstaand vermelde uitvoe-
ringsvormen, waarbij als sonde een molecuul wordt gebruikt met een
opvolging van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid
daarvan overeenkomstig een van de andere van de bovenstaand vermel-
30 de uitvoeringsvormen voor het isoleren uit menselijk chromosomaal
DNA van een menselijk chromosomaal interferon-gen.

Opgemerkt wordt dat hoewel enkelstrengs- of dubbelstrengs-
DNA initieel als sonde gebruikt kan worden, in het hybridisatie-
stadium een enkelstrengsvorm aanwezig zal zijn.

35 De uitvinding verschaft verder een werkwijze voor de berei-

ding van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan overeenkomstig een van de bovenstaand vermelde uitvoeringsvormen, anders dan de eerste drie daarvan, waarbij poly A-mRNA wordt geïsoleerd uit geïnduceerde fibroblastcellen, enkelstrengs cDNA wordt gesynthetiseerd onder toepassing van oligo dT primer en omgekeerde transcriptase en daaruit dubbelstrengs DNA wordt gesynthetiseerd onder toepassing van omgekeerde transcriptase of E. coli DNA polymerase I en desgewenst een primer. Bij voorkeur wordt een primer gebruikt in de derde trap van deze werkwijze. In het algemeen wordt het reactiemengsel gefractioneerd na de tweede trap en/of na de derde trap. Zelf op gang brengen wordt bij voorkeur na de tweede trap belemmerd. Het produkt kan na clonen worden geïdentificeerd door een primer te gebruiken voor het onderzoeken van de kolonies.

De uitvinding verschaft ook een werkwijze voor de bereiding van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan overeenkomstig een van de bovenstaand vermelde uitvoeringsvormen, anders dan de eerste drie daarvan, waarbij mRNA wordt geïsoleerd uit geïnduceerde fibroblastcellen, enkelstrengs cDNA wordt gesynthetiseerd onder toepassing van een specifiek primer en omgekeerde transcriptase en dubbelstrengs DNA daaruit wordt gesynthetiseerd onder toepassing van omgekeerde transcriptase of E. coli DNA-polymerase I en desgewenst een primer.

Dit kan als een modificatie van de bovenstaande werkwijze worden beschouwd.

Ook verschaft de uitvinding een werkwijze voor de bereiding van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan, dat een gedeelte heeft dat gemeenschappelijk is aan of verwant is met een gedeelte van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan volgens een van de eerste drie van de bovenstaand vermelde uitvoeringsvormen, waarbij als sonde een molecuul wordt gebruikt met een opvolging, die correspondeert met tenminste een deel van een gemeenschappelijk of verwant gedeelte voor het isoleren uit menselijk chromosomaal DNA van een menselijk chromosomaal gen.

De uitvinding verschaft tevens een plasmiderecombinant, dat

een plasmidevector omvat waarin op een inbrengplaats een zodanig gen of subeenheid daarvan of een equivalent daarvan is ingebracht dat het plasmiderecombinant in staat wordt gesteld tot vertaling in de correcte fase voor het mRNA dat overeenstemt met het inge-
5 brachte gen of de subeenheid daarvan of het equivalent daarvan en een bacteriële promotor heeft stroomopwaarts van en gelegen naast de indringingsplaats, zodanig dat het ingebrachte gen of de sub-
eenheid daarvan of het equivalent daarvan onder bacteriële promotor-
controle staat.

10 Het kan voordelig worden beschouwd om meerdere DNA-fragmenten in te brengen. Ook kan het wenselijk gedacht worden om meerdere bacteriële promotors te gebruiken. Volgens een voorkeursuitvoeringsvorm wordt tenminste één trp-promotor gebruikt. Het is bijzonder voordelig om een plasmiderecombinant te gebruiken die tenmin-
15 ste een deel van de DNA-opvolging die verantwoordelijk is voor verdunning van de transcriptie, mist. Een bijzonder voorbeeld van een geprefereerd plasmiderecombinant omvat een gemodificeerd derivaat van pWT 501. In bepaalde gevallen kan een voordeel worden gewonnen uit het feit, dat het ingebrachte DNA ook codeert voor een initiatiecodon en/of tenminste een deel van een ribosoom bindingsplaats.
20

De bereiding van een dergelijke plasmiderecombinant door een werkwijze waarbij het DNA wordt ingebracht op de inbrengingsplaats van een geschikte plasmidevector, vormt eveneens een uitvoeringsvorm van de uitvinding.

25 In een bepaald geval, kan een dergelijke werkwijze omvatten: de isolatie van een trp-promotor bevattend ongeveer 150 bp Hind III fragment uit pWT 501; zelfligatie; gedeeltelijke ontsluiting met Taq I; behandeling met S1 nuclease; behandeling met E. coli DNA-polymerase I; restrictie met Hind III; isolatie van een trp-promo-
30 tor bevattend ongeveer 100 bp fragment; ligatie tot een ongeveer 700 bp fragment, verkregen door behandeling van een recombinant plasmide van pWT 231, dat een gen of een subeenheid daarvan of een equivalent daarvan bevat, met Sac I, S1 nuclease, E. coli DNA-polymerase I en Hind III; restrictie met Hind III; en ligatie aan
35 met Hind III tot restrictie gebracht, bacterieel basisch fosfatase-

behandeld pAT 153.

De uitvinding verschaft verder een cel, welke daarin een dergelijk gen of een subeenheid daarvan of een equivalent daarvan of een dergelijke plasmiderecombinant ingebracht omvat.

5 In een voorkeursgeval is de cel een E. coli K-12 HB101 cel.

De bereiding van een dergelijke cel met een werkwijze, waarbij het DNA of het plasmiderecombinant in een cel wordt gebracht, vormt eveneens een uitvoeringsvorm van de uitvinding.

10 Volgens een verdere uitvoeringsvorm verschaft de uitvinding een werkwijze voor de bereiding van een eiwit met eigenschappen die lijken op die van menselijk interferon, waarbij een dergelijke cel wordt gekweekt en geëxprimeerd eiwit wordt gewonnen.

De uitvinding wordt aan de hand van het volgende nader toegelicht.

15 (1) Synthese van de oligodeoxynucleotiden.

De zes oligonucleotiden CpApGpGpTpTpGpTpApGpCpTpCpApT (IFIA), CpApGpGpTpTpGpTpApApCpTpCpApT (IFIB), CpTpCpTpTpTpCpCpApTpG (IFII), CpApGpCpTpCpTpTpTpCpCpApTpG (IFIII), GpApGpGpApGpApTpTpApApG (IFIV) en CpCpTpGpGpApApGpApApA (IFV), werden gesynthetiseerd volgens een conventionele triëstermethodologie (zie b.v. Hsiung, H.M., et al, 20 (1979), Nucl. Acids Res. 6, 1371 - 1385), en volgens het in fig. 14 weergegeven reactieschema, waarin N G^{isobu}, T, C^{bz} of A^{bz} voorstelt. De volledig beschermde oligonucleotiden werden gedeblokkeerd met 2% (w/v) benzeensulfonzuur, 0,1 M tetraethylammoniumfluoride in tetrahydrofuran (THF/pyridine/H₂O (8/1/1 volumeverhouding), 25 gevolgd door behandeling met ammonia. De gedeblokkeerde oligonucleotiden werden gezuiverd met hoge druk-vloeistofchromatografie (HPLC) over "Partisil 10 SAX", siliciumoxyde van microscopische afmetingen waarvan met quaternaire ammoniumgroepen een derivaat was gemaakt (Whatman).

30 (2) Fosforylering van de oligonucleotiden.

Elk synthetisch oligonucleotide (120 pmol) werd met 200 pmol 5'-(γ -³²P) ATP (Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, Engeland; specifieke activiteit groter dan 5000 Ci/mmol) en 35 3 eenheden polynucleotidekinase (EC 2.7.1.78), (1 eenheid is de hoeveelheid die de produktie van één nmol zuur onoplosbaar ³²P ka-

talyseert na incubatie gedurende 30 minuten bij 37°C volgens Richardson, C.C., (1972), Progress in Nucleic Acids Research, 2, 815), geïncubeerd in een totaal volume van 20 μdm^3 , dat 50 mM tris-HCl (tris-(hydroxymethyl)aminomethaanhydrochloride), pH 9,0, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA (ethyleendiaminetetra-azijnzuurdinatriumzout), 0,1 mM spermidine en 1 mM dithiothreitol (DTT) bevatte. Na 60 minuten bij 37°C toen het merendeel van de primermoleculen gelabeld was, werd het mengsel hetzij verdund tot 200 μdm^3 en ingesteld op 1% (w/v) natriumdodecylsulfaat (SDS) en 10 mM EDTA, en aangezien weinig oligonucleotide aanwezig was, 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ gist tRNA, geschud met een gelijk volume met water verzadigd fenol en opnieuw geschud na toevoeging van een gelijk volume chloroform, gecentrifugeerd (10.000 x g; 2 minuten) en de verkregen waterfase zoals boven ge-extraheerd, waarna deze tweemaal met een gelijk volume chloroform werd geëxtraheerd en vervolgens door ethanolprecipitatie werd ge-concentreerd (waarbij de NaCl-concentratie werd ingesteld op 200 mM, 2,5 volumehoeveelheden absolute ethanol werden toegevoegd en men gedurende 1 nacht bij -20°C liet staan), (IFIA en IB); hetzij eenvoudig gedurende 5 minuten op 100°C verwarmd (IFII, III, IV en V).

(3) Isolatie van poly A - mRNA.

20 dm^3 rolflessen van menselijke fibroblasts (FS-4 (afgeleid van menselijke voorhuidcellen) of 17/1 (afgeleid van menselijk embryo longcellen)) werden op gang gebracht met homolog interferon gedurende 1 nacht (60 internationale referentie-eenheden/ cm^3), alvorens te worden superinduceerd gedurende 5 uren met poly(I):poly(C) (30 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$), en cycloheximide (12 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$). Kwasi-geïnduceerde cellen kregen geen poly(I):poly(C). Cellen werden van het glasoppervlak verwijderd door kort te behandelen met een fosfaatgebufferde zout(PBS)-oplossing die 1,25 mg/cm^3 trypsine (EC 3.4.4.4), 0,5 mg/cm^3 EDTA, 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ cycloheximide bevatte, en verzameld in een ijskoude R.P.M.I. 1640 (Searle modificatie) medium (Flow Laboratories) dat 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ cycloheximide en 10% (v/v) kalfserum bevatte. Na snel wassen van de celpelleten (1000 x g; 5 minuten) met R.P.M.I. 1640, dat 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ cycloheximide bevatte, werden de cellen aan lyse

onderworpen door homogenisatie in 0,2 M tris-HCl, pH 9, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0,5% (w/v) SDS, 1 mg/cm³ heparine en vervolgens gede-
proteïniseerd met een gelijke volumehoeveelheid fenol, geëquili-
breerd in de bovenstaande buffer (zonder heparine), gevolgd door
5 drie extracties met een gelijke volumehoeveelheid van een gebuf-
ferd fenol/CHCl₃-mengsel (1 : 1 v/v). Na ethanolprecipitatie en
oplossen, werd het RNA selectief neergeslagen met 3 M NaCl en poly-
adenyleerd mRNA geïsoleerd door oligo (dT)-cellulosechromatografie
(zie b.v. Aviv, H., en Leder, P., (1972), Proc. Nat. Acad. Sci.,
10 USA., 69, 1408 - 1412).

(4) Omgekeerde transcriptie van fibroblast mRNA onder toepassing
van IFIA en IB.

75 pmol van 5' γ -³²P-gelabeld oligonucleotide (IFIA of
IB) werd geïncubeerd met 22,5 μ g poly(A) bevattend fibroblast mRNA
15 gedurende 1 uur bij 25°C in 36 μ dm³ 0,4 M KCl teneinde de primer
de gelegenheid te geven tot hybridisatie tot de complementaire op-
volging in het mRNA.

Deze werd vervolgens verdund met transcriptiemengsel ten-
einde een uiteindelijke oplossing te verkrijgen, die 0,5 mM van elk
20 van dATP, dCTP, dGTP en dTTP bevatte, 50 mM tris-HCl, pH 8, 4 mM
MgCl₂, 60 mM KCl, 5 mM DTT, 0,01% (v/v) Triton X-100 (niet-ionisch
detergens, isoöctylfenoxypolyethoxyethanol), 0,22 μ M IFIA of IB,
50 μ g/cm³ actinomycine D, 67 μ g/cm³ poly A-mRNA, 20 eenheden/cm³
ratteleverribonuclease-inhibitor, (1 eenheid is de hoeveelheid die
25 een 40% inhibitie van 5 mg pancreatische ribonuclease geeft vol-
gens Shortman, K., (1961), Biochim. Biophys. Acta., 51, 37) (zie
b.v. Gribnau, A.A.M., et al., (1969), Arch. Biochem. Biophys., 130,
48 - 52), en 100 eenheden/cm³ AMV (avian myeloblastosis virus) om-
gekeerde transcriptase (1 eenheid is de hoeveelheid die 1 nmol
30 dTMP opneemt in een door zuur precipiteerbaar produkt na incubatie
gedurende 10 minuten bij 37°C volgens Houts, G.E., et al., (1979),
J. Virol., 29, 517). De incubatie werd gedurende 60 minuten bij
37°C voortgezet, waarna het mengsel geëxtraheerd werd met fenol en
chloroform en geconcentreerd werd door ethanolprecipitatie (zie
35 boven onder (2)).

(5) Analyse van de omgekeerde transcriptieprodukten verkregen met IFIA en IB.

De met ethanol geprecipiteerde produkten werden opgelost in water en geïncubeerd bij aanwezigheid van 0,1 M NaOH en 1 mM EDTA gedurende 30 minuten bij 37°C. Een gelijk volume van 10 M ureum, 25% (w/v) sucrose, 0,05% (w/v) van zowel xyleencyanol als bromofenolblauw werd vervolgens toegevoegd en het mengsel werd gedurende 90 seconden tot 90°C verwarmd voordat het werd aangebracht op een 12,5% (w/v) polyacrylamidegel die 7 M ureum bevatte (zie b.v. Maxam, A., en Gilbert, W., (1977), Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 74, 560 - 564). Na elektroforese werd de gel autoradiografisch onderzocht om de positie van de gelabelde moleculen vast te stellen. Het gelabelde produkt van ongeveer 150 nucleotiden en alleen geproduceerd door mRNA uit geïnduceerde cellen werd van het gelschijfje geëluëerd en zijn opvolging bepaald (zie b.v. Maxam en Gilbert, loc cit). De opvolging is in fig.2 weergegeven.

(6) Bereiding van cDNA uit fibroblast polyA-mRNA.

cDNA werd bereid door het volgende mengsel gedurende 2 uren bij 37°C te incuberen: 0,5 mM dCTP, dGTP, dTTP, 0,15 mM γ -³²P-ATP (167 mCi/mmol), 5 mM DTT, 50 mM tris-HCl, pH 8, 10 mM MgCl₂, 0,01% (v/v) Triton X-100, 50 µg/cm³ actinomycine D, 20 eenheden/cm³ rattel lever ribonuclease-inhibitor, 50 mM KCl, 20 µg/cm³ oligo(dT)₁₂₋₁₈, 60 µg/cm³ polyA-mRNA en 100 eenheden/cm³ AMV omgekeerde transcriptase. Na incubatie werd het mengsel geëxtraheerd met fenol en chloroform en met ethanol neergeslagen (zie boven onder (2)). Het DNA werd door centrifugeren gewonnen, gedroogd en opgelost in 200 µl 0,3 N NaOH. Na incubatie gedurende 1 uur bij 50°C werd het geneutraliseerd en geëluëerd als de geëxcludeerde piek van een G50 (M) Sephadex, deeltjesvormig verknoopt gemodificeerd dextranpolymeer (Pharmacia), kolom (25 x 0,5 cm) geëquilibreerd in 50 mM NaCl/0,1% (w/v) SDS. De piekfracties werden verzameld en door ethanolprecipitatie geconcentreerd.

(7) Transcriptie van cDNA met oligonucleotiden IFII, III, IV en V.

Het 5' (³²P)-gelabeld oligonucleotide (3 µM) werd gepre-incubeerd met volledig enkelstrengs cDNA (440 µg/cm³), afgeleid van

totaal polyA-mRNA, gedurende 2 uren bij 25°C bij aanwezigheid van 0,4 M KCl. Dit werd vervolgens gedurende 3 uren bij 37°C geïncubeerd in een uiteindelijke oplossing, die thans 0,01% (v/v) Triton-X-100, 50 mM tris-HCl, pH 8, 80 mM DTT, 10 mM magnesiumacetaat, 0,5 mM van elk van dATP, dCTP, dGTP en dTTP, 80 mM KCl, 1000 eenheden/cm³ AMV omgekeerde transcriptase, 5' (³²P)-gelabeld oligonucleotide (0,12 μ M) en enkelstrengs cDNA (17,6 μ g/cm³) bevatte. Na extractie met fenol en chloroform werd de waterfase gevoerd door een G50 (M) Sephadex-kolom in 50 mM NaCl, 0,1% (w/v) SDS en de geëxcludeerde fractie werd geprecipiteerd met ethanol, opgelost en aan elektroforese onderworpen.

(8) Analyse van transcripts, geproduceerd door IFII, III, IV en V.

De transcripts werden hetzij zoals bovenstaand behandeld, d.w.z. voor de transcripts geproduceerd door IFIA en IB, afgezien van het gebruik van een 5% (w/v) polyacrylamidegel in 7 M ureum, hetzij werden ze bereid en aan elektroforese onderworpen door native 1,4% (w/v) agarosegels (zie b.v. Sharp, P.A., et al., (1973), Biochemistry, 12, 3055 - 3063), die vervolgens autoradiografisch werden behandeld. De interferongen werden geëluëerd uit geselecteerde agarosegelschijfjes door eerst te leiden door een 19G, vervolgens een 21G injectienaald (Gillette) en de gelfragmenten gedurende 3 uren bij 25°C te roeren in 10 mM Hepes, N-2-hydroxy-ethyl-piperazine-N'-2-ethaansulfonzuur (Ultrol), pH 7, 0,1 mM EDTA en 0,02% (v/v) Triton X-100. Na centrifugatie (700 x g, 5 minuten) door een glaswolstop, geplaatst op een GF/C en een GF/B filtreerpapier (Whatman), werd het filtraat geëxtraheerd met fenol en chloroform en vervolgens met ethanol neergeslagen.

Het DNA werd vervolgens zoals bovenstaand vermeld, tot opvolging gebracht. (Engels: "sequenced".)

(9) Bereiding van interferon-genen voor cloning.

(a) Bereiding van enkelstrengs cDNA uit totaal polyA-mRNA, geïsoleerd uit geïnduceerde fibroblasts:

cDNA werd gesynthetiseerd in een 20 cm³ incubatie, bevattende bovenstaand onder (6) beschreven bestanddelen. Na extractie met fenol en chloroform werd de waterfase chromatografisch behandeld over een

Sephadex G50 (M) kolom (28 x 4 cm) waaruit het cDNA werd geëluëerd in de geëxcludeerde fractie in 50 mM NaCl, 0,1% (w/v) SDS. Het cDNA werd geprecipiteerd met ethanol en vervolgens gewonnen, opgelost in 0,4 cm³ 0,2 N NaOH en bij 50°C gedurende 30 minuten geïncubeerd voordat gecentrifugeerd werd door een basische sucrosegradiënt zoals onderstaand wordt beschreven.

(b) Zuivering van interferon enkelstrengs cDNA:

Het bovenstaande cDNA werd verdeeld in twee gelijke porties en elk werd gecentrifugeerd met 36.000 omw./min bij 2°C gedurende 24 uren in een Beckmann SW 41 rotor door een 5 - 20% (w/w) isokinetische sucrosegradiënt (11 cm³) die 0,2 N NaOH, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA bevatte. Men verzamelde fracties van 0,5 cm³ door opwaartse verplaatsing onder toepassing van 50% (w/v) sucrose en overeenstemmende fracties van beide gradiënten werden verzameld, geneutraliseerd en met absolute ethanol neergeslagen. De neerslagen werden door centrifugatie verzameld, gewassen in absolute ethanol en vervolgens in 100 μ dm³ H₂O opgelost. De fracties die lange interferon cDNA-transcripts bevatten, werden geïdentificeerd door analyse van de verkregen produkten na kleine hoeveelheden van elke fractie op gang te hebben gebracht met (³²P) IFIII en omgekeerde transcriptase zoals boven onder (7) en (8) is beschreven. De hoofdfracties die tot de synthese van een interferon DNA-molecuul van ongeveer 700 nucleotiden in lengte leiden, werden verzameld ter voorbereiding op een grootschalige synthese van dubbelstrengs interferon-genen.

(c) Inhibitie van de zelf op gang brengende activiteit van het gezuiverde interferon enkelstrengs cDNA:

Alvorens een grootschalige bereiding van dubbelstrengs interferon-genen uit te voeren, werd de zelf op gang brengende activiteit van het gezuiverde interferon enkelstrengs cDNA (wanneer vervolgens geïncubeerd met omgekeerde transcriptase) verminderd door het cDNA gedurende 3 uren bij 37°C te incuberen in 1,5 cm³, bevattende 150 mM natriumcacodylaat, pH 7,2, 1 mM 2-mercaptoëthanol, 1 mM CoCl₂, 100 μ g/cm³ gelatine, 20 μ g/cm³ cDNA, 1,2 mM rATP en 600 eenheden/cm³ eindstandig transferase (EC 2.7.7.31), (1 eenheid is de hoeveelheid die 1 mmol dATP opneemt in een door zuur precipi-

teerbaar produkt in 1 uur bij 37°C onder toepassing van d(pA)₅₀ als primer volgens Bollum, R.J., et al., (1974), Methods in Enzymology, 29, 70), bevatte.

Na extractie met fenol en chloroform zoals boven beschreven, werd de waterfase op 0,3 N NaOH gebracht en gedurende 1 uur bij 50°C geïncubeerd. Het mengsel werd vervolgens geneutraliseerd en chromatografisch behandeld over een Sephadex G50 (medium) kolom (20 x 2 cm) en het cDNA geëluëerd in de geëxcludeerde fractie in 50 mM NaCl, 0,1% (w/v) SDS. Het werd vervolgens met ethanol neergeslagen en opnieuw in H₂O opgelost.

Het resultaat van deze werkwijze is de toevoeging van een enkel AMP-residu aan het oorspronkelijke 3'-hydroxyleindpunt van het cDNA. De alkalibehandeling geeft ook een mengsel van 2'- en 3'-fosfaatresiduen aan dit eindpunt die niet langer kunnen deelnemen aan een zelf op gang brengende reactie met omgekeerd transcriptase. Wanneer dubbelstrengs genen vervolgens worden gemaakt onder toepassing van een oligonucleotide teneinde specifieke transcriptie op gang te brengen op het enkelstrengs cDNA, wordt derhalve het gehalte aan verontreinigende zelf op gang gebrachte produkten verminderd en kan het resterende enkelstrengs cDNA vervolgens door S1-nuclease (EC 3.1.4.21) worden verminderd.

De zelf op gang brengende activiteit kan ook ernstig geremd worden door preïncubatie van het cDNA in geschikte buffermengsels met hetzij omgekeerde transcriptase hetzij eindpunttransferase bij aanwezigheid van de vier dideoxynucleosidetrifosfaten. Anderzijds kan het cDNA worden geïncubeerd met eindpunttransferase en deoxyadenosinetrifosfaat, waardoor een poly(dA)staart wordt verkregen aan het 3'-hydroxyleindpunt welke eveneens de zelf op gang brengen-de activiteit effectief remt.

(d) Synthese van dubbelstrengs interferon-genen onder toepassing van IFIII als primer:

Interferon enkelstrengs cDNA werd gezuiverd door centrifugeren door een basische sucrosegrediënt en zijn zelf op gang brengen-de activiteit werd zoals bovenstaand beschreven, verminderd. 10 µg van dit materiaal werd vervolgens gedurende 2 uren bij 25°C gepre-

incubeerd in $0,36 \text{ cm}^3$, bevattende $0,4 \text{ M KCl}$ en 575 pmol van IFIII dat tevoren geïncubeerd was met polynucleotidekinase (EC 2.7.1.78) en (γ - ^{32}P)ATP, eveneens zoals boven beschreven. Dubbelstrengs genen werden vervolgens geproduceerd door verder gedurende 3 uren bij 37°C te incuberen in $1,8 \text{ cm}^3$, die thans $0,01\%$ (v/v) Triton X-100 5 50 mM tris-HCl , pH 8, 20 mM DDT , $10 \text{ mM magnesiumacetaat}$, $0,5 \text{ mM dATP}$, dCTP , dGTP en dTTP , $1000 \text{ eenheden/cm}^3$ omgekeerde transcriptase, 80 mM KCl , $11,1 \text{ yg/cm}^3$ cDNA en $0,32 \text{ yM } (^{32}\text{P})\text{IFIII}$ bevatte. Na extractie met fenol en chloroform werden de genen geëluëerd uit 10 een Sephadex G50 (medium) kolom ($20 \times 2 \text{ cm}$) in 50 mM NaCl , $0,1\%$ (w/v) SDS. Gist tRNA werd toegevoegd als drager (3 yg/cm^3) en de concentratie NaCl ingesteld op $0,2 \text{ M}$ voordat neergeslagen werd met $2,5$ volumehoeveelheden absolute ethanol. Na gedurende 30 minuten staan bij -70°C werd het neerslag verzameld door centrifugeren en 15 het gedroogde pellet opnieuw opgelost in $100 \text{ ydm}^3 \text{ H}_2\text{O}$.

(e) Zuivering van dubbelstrengs interferon-genen:

Het DNA werd gesedimenteerd door een $5 - 20\%$ (w/w) lineaire sucrose-gradiënt, die 10 mM tris-HCl , pH 7,5, $0,8 \text{ M NaCl}$, 8 mM EDTA bevatte. Een $5,2 \text{ cm}^3$ gradiënt werd gecentrifugeerd in een Beckmann 20 SW 65 rotor bij 42.000 omw./min gedurende 18 uren bij 2°C , waarna fracties van $0,2 \text{ cm}^3$ verzameld en met ethanol neergeslagen werden. Het DNA werd door centrifugeren verzameld, opnieuw opgelost en vervolgens werden kleine hoeveelheden aan elektroforese onderworpen door een 5% (w/v) polyacrylamidegel die 7 M ureum bevatte, welke 25 vervolgens autoradiografisch werd onderzocht. De fracties die het 700 nucleotide interferon DNA-molecuul vertoonden werden verzameld.

(f) Bereiding van interferon-genen die Hind III schakels aan de eindpunten daarvan bevatten:

De bovenstaande verzamelde gradiëntfracties werden eerst behandeld met S1-nuclease door incubatie gedurende 30 minuten bij 30 37°C in 50 ydm^3 , bevattende $0,1 \text{ mM ZnSO}_4$, 150 mM NaCl , $25 \text{ mM natriumacetaat}$, pH 4,6, en $120 \text{ eenheden/cm}^3$ S1-nuclease (1 eenheid is de hoeveelheid die 10 yg nucleïnezuur in 10 minuten bij 45°C oplost volgens Vogt. V.M., (1973), Eur. J. Biochem., 33, 192).

Na toevoeging van $0,5 \text{ ydm}^3$ 10% (w/v) SDS, 1 ydm^3 $0,5 \text{ M EDTA}$ 35 en 1 ydm^3 $0,5 \text{ M tris-HCl}$, pH 8,3, werd het mengsel geëxtraheerd met

fenol en chloroform en werd de waterfase met ethanol neergeslagen. In dit stadium was er een totale hoeveelheid aan 0,24 μg dubbelstrengs DNA.

Teneinde te verzekeren dat er stompe einden aanwezig waren voor de daaropvolgende ligatie met Hind III schakelmoleculen, werd het DNA uit ethanol gewonnen en gedurende 20 minuten bij 14°C geïncubeerd in 50 μdm^3 bevattende 50 mM tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl_2 , 1 mM 2-mercaptoëthanol, 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP en dTTP en 40 eenheden/ cm^3 van E. coli DNA polymerase I (EC 2.7.7.7), (1 eenheid is de hoeveelheid die 10 nmol aan totale nucleotiden opneemt in een door zure precipiteerbare fractie in 30 minuten bij 37°C onder toepassing van poly-d(A-T) als primer volgens Richardson, C.C., et al., (1964), J. Biol. Chem., 239, 222). Het DNA werd vervolgens op de gebruikelijke wijze geëxtraheerd, met ethanol neergeslagen en het door centrifugeren verkregen pellet vervolgens gedroogd.

2,5 μg Hind III schakel (Collaborative Research) werd gefosforyleerd door eerst incuberen gedurende 30 minuten bij 37°C in 50 μdm^3 , bevattende 50 mM tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl_2 , 10 mM 2-mercaptoëthanol, 0,25 mM (γ - ^{32}P)ATP (20 mCi/ μmol), 50 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ BSA (bovine serum albumine) en 100 eenheden/ cm^3 polynucleotidekinase. Teneinde een volledige fosforylering te verzekeren, werd het mengsel gedurende nog eens 30 minuten bij 37°C geïncubeerd na de toevoeging van 10 μdm^3 , bevattende 50 mM tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl_2 , 3,75 mM rATP en 500 eenheden/ cm^3 polynucleotidekinase. Het mengsel werd vervolgens geëxtraheerd met fenol en chloroform en neergeslagen met ethanol na de toevoeging van gist tRNA tot 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Ligatie van de gefosforyleerde Hind III schakels aan de interferon-genen werd gerealiseerd door het interferon-gen pellet op te lossen in 40 μdm^3 , bevattende 50 mM tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl_2 , 1 mM rATP, 20 mM DTT, 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ gefosforyleerde schakel en ongeveer 480 eenheden/ cm^3 van T4 DNA ligase (EC 6.5.1.1), (1 eenheid is de hoeveelheid die de omzetting van 1 nmol $^{32}\text{PP}_i$ in (α / β - ^{32}P)-ATP in 20 minuten bij 37°C katalyseert volgens Weiss, B., et al., (1968), J. Biol. Chem., 243, 4543). Dit werd vervolgens gedurende 16 uren bij 25°C geïncubeerd.

Deze omstandigheden gaven een ongeveer 100-voudige molaire overmaat van schakel ten opzichte van DNA.

Na verwarming van het mengsel gedurende 5 minuten op 65°C werd het DNA tot restrictie gebracht met Hind III door toe te voegen 600 μdm^3 van een mengsel, dat 400 eenheden/ cm^3 Hind III (EC 3.1.23.21) bevatten (1 eenheid is de hoeveelheid die 1 μg λ -DNA in 15 minuten bij 37°C in 50 μdm^3 ontsloot), 3 mM DTT, 167 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ gelatine, 83 mM tris-HCl, pH 7,5, 83 mM NaCl, 17 mM MgCl_2 en 8 mM 2-mercaptoëthanol. Na incubatie gedurende 2 uren bij 37°C werd het mengsel op 0,2% (w/v) SDS en 20 mM EDTA gebracht en werd het DNA geëxtraheerd met fenol en chloroform en werd gist tRNA toegevoegd aan de uiteindelijke waterfase om een concentratie van 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ te verkrijgen. Deze werd vervolgens chromatografisch behandeld over een Sephadex G150 superfijn kolom (50 x 0,7 cm) waar de dubbelstrengs genen geëluëerd werden in de geëxcludeerde fractie, onder toepassing van 50 mM NaCl, 0,1% (w/v) SDS en 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ gist tRNA. Laatstgenoemde werd vervolgens met ethanol neergeslagen nadat de tRNA-concentraties op 10 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ waren gebracht. Het gewonnen DNA bevatte naar schatting ongeveer 0,125 μg dubbelstrengs genen.

20 (g) Uiteindelijke fractionering van interferon-genen:

Het DNA werd vervolgens opgelost in 50 μdm^3 H_2O en 20 μdm^3 werd aan elektroforese onderworpen door een natieve 1,4% (w/v) agarosegel (20 x 14 x 0,5 cm) gedurende 2 uren bij 120 V. DNA tussen 600 en 1000 bp in lengte werd vervolgens uit de gel op de volgende wijze geëluëerd: het geschikte schijfje werd uitgesneden en door een Gillette 21 G naald gevoerd. Laatstgenoemde werd gewassen met 4 cm^3 10 mM HEPES, pH 7,5, 0,1 mM EDTA, 0,02% (v/v) Triton X-100, 65 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ gist tRNA en het schijfje werd bij -70°C bevroren. Het werd vervolgens ontdooid en geagiteerd op een rotatiemenger gedurende 1 nacht bij kamertemperatuur (ongeveer 25°C) voordat het gefiltreerd werd door een Whatman 52 papier. Het filtraat werd ingesteld op 0,1 M ammoniumacetaat, 2 mM magnesiumacetaat, 0,02% (w/v) SDS en gebonden aan een 1 cm^3 kolom van diëthylaminoëthyl (DEAE) 52 cellulose. Deze werd vervolgens driemaal gewassen met 1,5 cm^3 hoeveelheden van bovenstaande buffer voordat het DNA werd ge-

elueerd met $0,5 \text{ cm}^3$ hoeveelheden van $1,1 \text{ M NaCl}$, $0,1 \text{ M ammoniumace-$
taat, $2 \text{ mM magnesiumacetaat}$, $0,02\% \text{ (w/v) SDS}$, $0,02 \text{ mM EDTA}$. Het
DNA elueerde met de 2e en 3e porties die vervolgens verzameld wer-
den, werden aangevuld met 5 yg gist tRNA en vervolgens met ethanol
5 werden neergeslagen. Het neerslag werd gewonnen door centrifugeren,
gewassen met absolute ethanol, gedroogd en opgelost in 20 ydm^3 wa-
ter. 4 ydm^3 werd genomen voor vloeistofscintillatietelling en de
rest (ongeveer 8 mg) werd door vacuümdessicatie gedroogd.

(10) Clonen van de interferon-genen in $\chi 1776$ onder toepassing van
10 pBR 322 als plasmidevector.

De vector werd als volgt bereid: 10 yg van het plasmide pBR
322 werd aan restrictie onderworpen met Hind III, geëxtraheerd met
fenol en chloroform en neergeslagen met ethanol. Het gewonnen line-
aire plasmide werd vervolgens gedurende 30 minuten bij 65°C geïncu-
beerd in 25 ydm^3 , bevattende 20 mM tris-HCl , pH 7,5, $0,1\% \text{ (w/v)}$
15 SDS en $0,7 \text{ mg/cm}^3$ bacteriële basische fosfatase (EC 3.1.3.1), voor-
dat driemaal geëxtraheerd werd met fenol en chloroform, tweemaal
met ether en opnieuw neergeslagen werd met ethanol. Het gewonnen
precipitaat werd vervolgens in 100 ydm^3 water opgelost.

20 Het gedroogde gen-pellet (zie boven onder (9)(g)) werd ver-
volgens opgelost in 10 ydm^3 , bevattende 50 mM tris-HCl , pH 7,8,
 10 mM MgCl_2 , 1 mM rATP , 20 mM DTT , 10 yg/cm^3 van de behandelde
vector DNA en ongeveer 16 eenheden/cm^3 van T4 DNA ligase. Vervol-
gens werd dit mengsel gedurende 1 nacht bij 15°C geïncubeerd voor-
25 dat verdund werd tot 100 ydm^3 met 10 mM tris-HCl , pH 7,5, 1 mM
EDTA, $0,1 \text{ M NaCl}$ en werd gebruikt om E. coli K-12 $\chi 1776$ te trans-
formereren volgens bekende methoden (zie b.v. Curtiss, R., III, et
al., (1976), Recombinant Molecules: Impact on Science and Society
(R.F.Beers, Jr., en E.G.Bassett (Eds.), 45 - 56). Op deze wijze werd
30 een totaal van 370 ampicilline (100 yg/cm^3) resistente transforman-
ten verkregen, die vervolgens op gevoeligheid voor 10 yg/cm^3 tetra-
cycline werden onderzocht. 62% bleek tetracyclinegevoelig te zijn
en werd derhalve geïdentificeerd als recombinanten. 160 van laatst-
genoemde werden vervolgens gegroeid op milliporiënfilters, ge-
35 plaatst op cultuurplaten teneinde interferon-gen recombinanten te

identificeren door koloniehybridisatie met (γ - 32 P)IFIA en (γ - 32 P)-IFIV.

(11) Onderzoek van recombinanten.

5 Recombinanten werden gegroeid op nitrocellulosefilters (9 cm diameter) totdat de kolonies een diameter van 2 of 3 mm hadden bereikt. Nadat de filters van de platen waren opgetild, werden ze gedurende 7 minuten geplaatst op een kussen van Whatman No.1 filtreerpapier, gedrenkt in 0,5 N NaOH, vervolgens gedurende 2 minuten op een kussen, gedrenkt in 1 M tris-HCl, pH 7,5, en vervolgens gedurende 7 minuten op een kussen, gedrenkt in 0,5 M tris-HCl, pH 7,5, 1,5 M NaCl. De filters werden vervolgens gedroogd door ze op een vacuumspruitstuk te plaatsen gedurende ongeveer 5 minuten en ten slotte gewassen met 100 cm³ absolute ethanol voordat ze gedurende 2 uren op 80 - 85°C werden verwarmd.

15 De filters werden gedurende 2 uren bij 25°C gepreïncubeerd in 3 x SSC (1 x SSC is 0,15 M NaCl, 0,015 M natriumcitraat, pH 7,6), bevattende 0,02% (w/v) BSA, 0,02% (w/v) Ficoll (copolymeer van sucrose en epichloorhydrien) en 0,02% (w/v) polyvinylpyrrolidon voordat vloeistof werd afgevoerd en ze geplaatst werden op een filtreerpapier om gedurende enkele minuten aan de lucht te drogen. De oligonucleotiden IFIA en IFIV werden radioactief gelabeld met (γ - 32 P)ATP en polynucleotidekinase zoals bovenstaand beschreven en vervolgens gesuspendeerd in driemaal SSC. 300 μ dm³ (bevattende 0,85 pmol van elk (γ - 32 P) oligonucleotide (ongeveer 1 μ Ci/pmol) werd uniform over elk filter aangebracht (nu staande op een niet absorberend oppervlak) en gedurende 5 minuten met rust gelaten om in te weken. De filters werden ondergedompeld in lichte paraffine en gedurende 2 of 3 dagen bij 25°C geïncubeerd. Vervolgens werden ze van olie ontdaan, in chloroform gespoeld, met lucht gedroogd en viermaal gewassen in 3 x SSC bij 25°C (20 minuten per wasbeurt), 30 voordat ze tweemaal in 2 x SSC bij dezelfde temperatuur werden gewassen. Na voorzichtig drogen met vloeipapier werden de filters ingesloten in een polyetheen zak en autoradiografisch onderzocht bij -70°C in een Kodak normale versterker cassette.

35 Het autoradiogram liet de aanwezigheid van vijf kolonies

zien die significant donkerder waren dan de rest. Plasmide DNA werd uit deze volgens bekende methoden bereid (zie b.v. Birnboim, H.C., en Doly, J., (1979), Nucl. Acids Res., 7, 1513 - 1523) en daaropvolgende restrictie en nucleotideopvolgingsanalyse bevestigden dat elk van deze recombinanten een fibroblastinterferon-gen bevatte, dat codeerde voor het rijpe interferonpolypeptide en de 3'-niet vertaalde mRNA-opvolging.

(12) Overbrenging van het interferon-gen in pWT 2 x 1 expressie-plasmiden.

Plasmide DNA werd bereid uit een van de bovenstaande interferon-recombinanten door centrifugeren van een geklaard lysaat door dichtheidsgradiënten, bevattende ethidiumbromide (zie b.v. Katz, L., et al., (1973), J. Bacteriol. 114, 577 - 591; en Wensink, P.C., et al., (1974), Cell, 3, 315 - 325). 3 μ g werd vervolgens tot restrictie gebracht met Hind III en het geëxtraheerde DNA werd aan elektroforese onderworpen door een natieve 5% (w/v) polyacrylamide-gel. Het interferon-gen (ongeveer 730 bp) werd zichtbaar gemaakt door kleuren met 1 μ g/cm³ ethidiumbromide en bekijken onder UV-licht (254 nm), waardoor excisie van een klein gelschijfje dat het gen bevatte, mogelijk werd gemaakt. Dit schijfje werd gedispergeerd door te leiden door de opening van een 1 cm³ kunststof injectiespuit, welke vervolgens gewassen werd met 4 volumehoeveelheden, ten opzichte van het gelschijfje, AGEB (0,5 M ammoniumacetaat, 10 mM magnesiumacetaat, 0,1% (w/v) SDS en 0,1 mM EDTA), dat vervolgens gemengd werd met gelsuspensie en gedurende 16 uren bij 37°C rustig werd geschud. Gist tRNA werd toegevoegd om een uiteindelijke concentratie van 25 μ g/cm³ te krijgen voordat het mengsel gecentrifugeerd werd door een Whatman 52 papier in een 2 cm³ injectiespuit en vervolgens het papier met AGEB werd gewassen. Het verzamelde filtraat werd vervolgens vijfmaal met H₂O verdund voordat chromatografie volgde over een 1 cm³ kolom van DEAE 52-cellulose zoals bovenstaand onder (9)(g) is beschreven. Het eluaat (1 cm³ totaal) werd tweemaal geëxtraheerd met 1 cm³ isoamylalcohol, verzadigd met 1/5 x AGEB bevattende 1,1 M NaCl (om het ethidiumbromide te verwijderen) voordat neergeslagen werd met ethanol na de toevoeging van

5 μg gist tRNA. Het DNA werd gewonnen en opgelost in $50 \mu\text{dm}^3 \text{H}_2\text{O}$ (ongeveer $0,2 \mu\text{g}$ DNA).

5 Vervolgens werd $4 \mu\text{dm}^3$ geligateerd (in een uiteindelijk volume van $10 \mu\text{dm}^3$) met 80 mg van pWT 211, pWT 221 of pWT 231, dat vooraf tot restrictie was gebracht met Hind III en vervolgens behandeld met basische fosfatase om ligatie van het moederplasmide (zie boven onder (10)) tot een minimum te beperken. Elke ligatie werd vervolgens gebruikt voor het transformeren van E. coli K-12 HB101 onder toepassing van bekende methoden (zie b.v. Emtage, J.S., et al., (1980), Nature 283, 171 - 174). Transformanten werden ge-
10 groeid op L-agarplaten, die $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ampicilline bevatten (in feite werd carbenicillinenatrium (Beecham) gebruikt, dat een derivaat is dat kan worden beschouwd als een equivalent; carbenicilline is α -carboxybenzylpenicilline) en plasmide DNA werd in elk geval
15 uit 6 - 12 kolonies bereid. Door Pst I (EC 3.1.23.31) restricties uit te voeren en de produkten met gelelektroforese te analyseren, konden interferonrecombinanten worden geïdentificeerd alsook de oriëntatie van het interferon-gen ten opzichte van de tryptofaan-promotoropvolging. Voor elk van de drie pWT 2 x 1 plasmiden, werd
20 een recombinant met het interferon-gen in de vereiste oriëntatie voor expressie geselecteerd en onderzocht op zijn vermogen tot de produktie van biologisch actief interferon.

(13) Inductie van expressieplasmiden die het interferon-gen bevatten.

25 150 cm^3 culturen van elk van de drie pWT 2 x 1 interferongen clonen werden gegroeid in L-bouillon (luriabouillon: 1% (w/v) bactotrypton, 0,5% (w/v) bactogistextract, 0,5% (w/v) NaCl), 0,2% (w/v) glucose, 0,004% (w/v) thymine, pH 7) bevattende ampicilline tot een O.D._{600 nm} van ongeveer 0,3. De bacteriën werden gepelle-
30 teerd door centrifugeren, gewassen en vervolgens hersuspendeerd in inductiemedium ($42 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, $22 \text{ mM KH}_2\text{PO}_4$, $8,6 \text{ mM NaCl}$, $18,7 \text{ mM NH}_4\text{Cl}$, $0,1 \text{ mM CaCl}_2$, $1,0 \text{ mM MgSO}_4$, $1 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ vitamine B1, 0,2% (w/v) glucose, 0,5% (w/v) casaminozuren missend tryptofaan (Difco), $20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ 3 β -indoolacrylzuur en $100 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ ampicilline). Na incubatie gedurende 4 uren bij 37°C (op welk tijdstip het O.D._{600 nm} on-

35

geveer 1,0 bedroeg) werden de cellen gecentrifugeerd en geëxtraheerd zoals onderstaand beschreven.

(14) Extractie van interferon uit bacteriën.

De volgende bewerkingen werden uitgevoerd bij 2°C: de bacteriële pellets werden hersuspendeerd in 1,2 cm³ PBS, bevattende 2% (w/v) HSA (menselijk serumalbumine). Een gelijke volumehoeveelheid van 50% (w/v) sucrose, bevattende 0,1 M tris-HCl, pH 8, en 1% (w/v) HSA werd vervolgens toegevoegd, gevolgd door 0,8 cm³ van een verse lysozymeoplossing (10 mg/cm³ in PBS). Na 15 minuten werd 0,8 cm³ van 0,5 M EDTA, pH 8,5, toegevoegd en werden de cellen gedurende nog eens 10 minuten met rust gelaten. 4 cm³ 0,6% (v/v) Triton X-100 werd vervolgens toegevoegd en na mengen gedurende 10 minuten, werd het extract aan geluidgolven blootgesteld (Engels: "sonicated") om de viscositeit te verlagen en volledige lyse te verzekeren, vervolgens geultracentrifugeerd met 50.000 omw./min in een Beckman-Ti 50 rotor gedurende 2 uren. De bovendrijvende vloeistof werd gedialyseerd tegen PBS, geklaard door centrifugeren (10 minuten met 10.000 omw./min) voordat geanalyseerd werd op interferonactiviteit door de bescherming te volgen die aan Vero-cellen werd gegeven tegen het cpe van EMC-virus in een in vitro microplaatanalysestelsel (zie b.v. Dahl, H., en Degre, M., (1972), Acta. Path. Microbiol. Scan., 1380, 863).

Een alternatieve extractiemethode omvat eenvoudig aan geluidstrillingen blootstellen van de geïnduceerde bacteriën in 10 mM tris-HCl, pH 8,0, gevolgd door centrifugeren gedurende 30 minuten bij 15.000 x g en verzamelen van de bovendrijvende vloeistof.

(15) Constructie van gemodificeerde expressierecombinanten.

Het plasmide pWT 501 bevat een 150 bp Hind III fragment dat de trp-promotor en een deel van de gen-opvolging, die codeert voor het trp-leider polypeptide bevat. Dit fragment werd gewonnen uit een natieve 5% (w/v) polyacrylamidegel en zelf geligateerd onder toepassing van T4 DNA-ligase (10). De concatemeren werden vervolgens partieel ontsloten met Taq I alvorens eerst te behandelen met S1-nuclease, vervolgens E. coli DNA-polymerase I en tenslotte met Hind III (9)(f). Op deze wijze leidt de vereiste Taq I splitsing

binnen de opvolging die correspondeert met de ribosoom bindings-
plaats in het mRNA-gebied dat codeert voor het trp-leiderpolypepti-
de, tot een fragment van ongeveer 100 bp na de Hind III restrictie.
Dit fragment werd geïsoleerd uit een 8% (w/v) natieve polyacryl-
amidegel (12) ter voorbereiding op ligatie aan het Sac I/Hind III
5 fragment van het interferon-gen. Het laatstgenoemde fragment werd
verkregen door eerst het interferon-gen, gecloond in pWT 231 met
Sac I te ontsluiten. Na behandeling met S1-nuclease, vervolgens met
E. coli DNA-polymerase I, werd het DNA tot restrictie gebracht met
10 Hind III en het verkregen fragment van ongeveer 700 bp gewonnen uit
een 5% (w/v) natieve polyacrylamidegel gewonnen.

De twee fragmenten werden vervolgens aan elkaar geligateerd
door incuberen gedurende 16 uren bij 25°C in een uiteindelijk volu-
me van 20 μdm^3 , bevattende 50 mM tris-HCl, pH 7,8, 10 mM MgCl_2 ,
15 1 mM ATP, 20 mM DTT, ongeveer 480 eenheden/ cm^3 T4 DNA ligase,
0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ van het Hind III/Taq I trp-fragment en 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ van het
Sac I/Hind III fragment van het interferon-gen. Na restrictie met
Hind III, werd het samengevoegde molecuul getransformeerd in E.coli
K-12 HB101 onder toepassing van pAT 153 als de vector. Laatstge-
20 noemde was vooraf tot restrictie gebracht met Hind III voor de be-
handeling met bacteriële basische fosfatase (EC 3.1.3.1) om het ge-
halte aan niet-recombinerende transformanten (10) te verlagen.
Plasmide DNA werd volgens bekende methoden uit transformanten be-
reid (zie b.v. Katz, et al., en Wensink, et al., loc cit), waarna
25 dit geanalyseerd werd door restrictie-enzymindeling en ook door nu-
cleotideopvolging. Op deze wijze werden verschillende recombinanten
die het vereiste samengevoegde molecuul bevatten, geïdentificeerd.
Deze werden vervolgens geïnduceerd om interferon te produceren zo-
als bovenstaand beschreven (13), met dien verstande, dat de concen-
30 tratie van 3/ β -indoolacrylzuur ingesteld werd op 2,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Om radioactief interferon te bereiden werden bacteriën zoals
beschreven, geïnduceerd, maar bij afwezigheid van casaminozuren en
bij aanwezigheid van 5 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ 3/ β -indoolacrylzuur. Aan het eind van
de inductieperiode werden porties van 1 cm^3 geïncubeerd gedurende
35 nog eens 15 minuten met 5 μCi van een (^{14}C)-aminozuurmengsel. De

bacteriën werden vervolgens gecentrifugeerd en het pellet gelyseerd door toevoeging van 50 μdm^3 van een mengsel van 10% (v/v) glycerol, 5% (w/v) 2-mercaptoëthanol, 3% (w/v) SDS, 62,5 mM tris-HCl, pH 6,8, 0,01% (w/v) bromofenolblauw en verwarming gedurende 2 minuten op 90°C. Monsters werden vervolgens aan elektroforese onderworpen door 12,5% (w/v) polyacrylamidegels volgens bekende methoden (zie b.v. Laemmli, U.K., (1970), Nature, 227, 680 - 685). De gel werd vervolgens gedroogd en autoradiografisch onderzocht om het interferon-polypeptide zichtbaar te maken (zie fig.12).

10

C o n c l u s i e s :

=====

1. Gen voor de expressie van een eiwit met eigenschappen die lijken op die van menselijk interferon, omvattende een coderingsstreng en een complementaire streng, waarbij de coderingsstreng de volgende opvolging bevat:

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.-
TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.-
GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.-
GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.-
TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.-
10 TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.-
TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.-
AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.-
GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.-
15 CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.-
GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.-
AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.-
20 ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.-
AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.CTT.-
CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.-
GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.-
TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.-
25 AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TCA.ACA.TGG.CA 3'

of een subeenheid daarvan of een equivalent daarvan.

2. Gen volgens conclusie 1, waarvan de coderingsstreng de volgende opvolging bevat:

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.-
30 TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.-
GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.-
GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.-

TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.-
TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.-
TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.-
AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
5 ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.-
GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.-
CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.-
GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.-
AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-
10 ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.-
ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.-
AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.CTT.-
CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.-
15 GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.-
TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.-
AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TCA.ACA.TGG.CAG.TTT.TAA.TTT.-
CGA.TTT.CAT.TTA.TAT.AAC.CA...3'

of een subeenheid daarvan of een equivalent daarvan.

20 3. Gen volgens conclusie 1 of 2, waarvan de coderingsstreng de volgende opvolging omvat:

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.-
CCT.TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.-
GAC.ACT.GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.-
25 CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.-
CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.-
AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.-
AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAT.TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.-
TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.-
30 CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.-
CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.-
ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.-
AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.-
GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.-
35 CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.-

ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.-
 GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.-
 TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.-
 AGA.TCT.CCT.AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.-
 5 TCA.AGC.ATT.CTT.CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.-
 GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.-
 TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.-
 TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.-
 AAG.TCA.ACA.TGG.CAG.TTT.TAA.TTT.CGA.TTT.GAT.TTA.TAT.-
 10 AAC.CA..3'

of een subeenheid daarvan.

4. Gen volgens een of meer van de conclusies 1 - 3, waarvan de coderingsstreng de volgende opvolging omvat:

5' TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.-
 15 CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.-
 ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.-
 TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.-
 GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.-
 CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.CTC.-
 20 AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.-
 CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.-
 ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.-
 CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.-
 GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.-
 25 CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.-
 TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.-
 AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.-
 GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.-
 ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.-
 30 TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.-
 GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.CTT.CAA.CCA.GCA.GAT.-
 GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.GCA.TAT.GAA.-
 AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.TTA.TGA.-
 GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.AAA.-
 35 TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TC..3'

of een equivalent daarvan.

8100558

5. Gen volgens een of meer van de conclusies 1 - 3, waarvan de coderingsstreng de volgende opvolging omvat:

5' ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.GCT.CTC.CTG.TTG.-
TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.-
5 CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.-
AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.-
CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.-
AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.-
ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.-
10 AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.-
GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.-
CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.-
GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.-
AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.-
15 AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.-
GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.-
GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA... 3'

of een equivalent daarvan.

6. Gen volgens een of meer van de conclusies 1 - 3, waarvan de coderingsstreng de volgende opvolging omvat:

5' ATG.AGC.TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.-
AGC.AAT.TTT.CAG.TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.-
GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.-
GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.-
25 AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.-
AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.-
GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.CTC.CTG.GCT.AAT.-
GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.GTC.CTG.GAA.-
GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.AAA.CTC.-
30 ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.ATT.-
CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.-
TGG.ACC.ATA.TGC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.-
TTC.ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA. 3'

of een equivalent daarvan.

35 7. Subeenheid van een gen volgens een of meer van de conclu-

sies 1 - 6.

8. Gen of equivalent daarvan of een subeenheid daarvan, volgens een of meer van de conclusies 1 - 7, in wezen zoals hier beschreven.

5 9. Werkwijze voor de bereiding van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan, volgens een of meer van de conclusies 4 - 8, waarbij polyA-mRNA wordt geïsoleerd uit geïnduceerde fibroblastcellen, enkelstrengs cDNA wordt gesynthetiseerd onder toepassing van oligo dT primer en omgekeerde transcriptase en dubbelstrengs DNA daaruit wordt gesynthetiseerd onder toepassing van omgekeerde transcriptase of E. coli DNA polymerase I en desgewenst een primer.

10 10. Werkwijze voor de bereiding van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan, volgens een of meer van de conclusies 4 - 8, waarbij mRNA wordt geïsoleerd uit geïnduceerde fibroblastcellen, enkelstrengs cDNA wordt gesynthetiseerd onder toepassing van een specifieke primer en omgekeerde transcriptase en dubbelstrengs DNA daaruit wordt gesynthetiseerd onder toepassing van omgekeerde transcriptase of E. coli DNA polymerase I, en desgewenst een primer.

20 11. Werkwijze volgens conclusie 9 of 10, waarbij in de derde trap een primer wordt gebruikt.

25 12. Werkwijze volgens een of meer van de conclusies 9 - 11, waarbij het reactiemengsel na de tweede trap en/of de derde trap wordt gefractioneerd.

13. Werkwijze volgens een of meer van de conclusies 9 - 12, waarbij zelf op gang brengen na de tweede trap wordt belemmerd.

30 14. Werkwijze volgens een of meer van de conclusies 9 - 13, waarbij het produkt na cloning wordt geïdentificeerd door een primer te gebruiken voor het onderzoeken van de kolonies.

15. Werkwijze volgens een of meer van de conclusies 9 - 14 voor de bereiding van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan, volgens een of meer van de conclusies 4 - 8, in wezen zoals hier beschreven.

35 16. Gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan vol-

gens een of meer van de conclusies 4 - 8, bereid met een werkwijze volgens een of meer van de conclusies 9 - 15.

17. Werkwijze voor de bereiding van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 3, waarbij als sonde een molecuul wordt gebruikt met een opvolging van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 8 of 16 voor het isoleren uit menselijk chromosomaal DNA van een menselijk chromosomaal interferon-gen.

18. Werkwijze volgens conclusie 17 voor de bereiding van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan, volgens een of meer van de conclusies 1 - 3, in wezen zoals hier beschreven.

19. Gen of equivalent daarvan of een subeenheid daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 3, bereid met een werkwijze volgens conclusie 17 of 18.

20. Werkwijze voor de bereiding van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan, dat een gedeelte gemeenschappelijk met of verwant aan een gedeelte van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 3 heeft, waarbij als sonde een molecuul wordt gebruikt met een opvolging, die correspondeert met tenminste een deel van het gemeenschappelijke of verwante deel voor het isoleren uit menselijk chromosomaal DNA van een menselijk chromosomaal gen.

21. Werkwijze voor de bereiding van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan dat een deel gemeenschappelijk met of verwant aan een deel van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 3 heeft, in wezen zoals hier beschreven.

22. Gen of equivalent daarvan of subeenheid daarvan dat een deel gemeenschappelijk met of verwant aan een deel van een gen of een equivalent daarvan of een subeenheid daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 3 heeft, bereid met een werkwijze volgens conclusie 20 of 21.

23. Plasmidrecombinant, omvattende een plasmidevector met daarin ingebracht op een inbrengingsplaats een gen of een subeenheid

- daarvan of een equivalent daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 8, 16 of 19, welk plasmiderecombinant vertaling in de correcte fase mogelijk maakt voor het mRNA, dat overeenstemt met het ingebrachte gen of subeenheid daarvan of equivalent daarvan en
- 5 een bacteriële promotor heeft stroomopwaarts van of naast de inbrengingsplaats zodat het ingebrachte gen of subeenheid daarvan of equivalent daarvan onder bacteriële promotorcontrole staat.
24. Plasmiderecombinant volgens conclusie 23, omvattende daarin ingebracht meerdere genen of subeenheden daarvan of equivalenten
- 10 daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 8, 16 of 19.
25. Plasmiderecombinant volgens conclusie 23 of 24, omvattende meerdere bacteriële promotors.
26. Plasmiderecombinant volgens een of meer van de conclusies 23 - 25, omvattende tenminste één trp-promotor.
- 15 27. Plasmiderecombinant volgens een of meer van de conclusies 23 - 26, welke tenminste een deel van de DNA-opvolging die verantwoordelijk is voor verdunning van de transcriptie, mist.
28. Plasmiderecombinant volgens een of meer van de conclusies 23 - 27, omvattende een gemodificeerd derivaat van pWT 501.
- 20 29. Plasmiderecombinant volgens een of meer van de conclusies 23 - 28, omvattende een plasmidevector met daarin ingebracht een gen of een subeenheid daarvan of een equivalent daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 8, 16 of 19, dat ook codeert voor een initiatiecodon en/of tenminste een deel van een ribosoom bindings-
- 25 plaats.
30. Plasmiderecombinant volgens een of meer van de conclusies 23 - 29, in wezen zoals hier beschreven.
31. Werkwijze voor de bereiding van een plasmiderecombinant volgens een of meer van de conclusies 23 - 30, omvattende het inbrengen van een gen of een subeenheid daarvan of een equivalent daarvan
- 30 volgens een of meer van de conclusies 1 - 8, 16 of 19 in een inbrengingsplaats van een geschikte plasmidevector.
32. Werkwijze volgens conclusie 31, omvattende: isolatie van een trp-promotor bevattend ongeveer 150 bp Hind III fragment uit pWT
- 35 501; zelfligatie; partiële ontsluiting met Taq I; behandeling met

- S1-nuclease; behandeling met E. coli DNA-polymerase I; restrictie met Hind III; isolatie van een trp-promotor bevattend ongeveer 100 bp fragment; ligatie aan een ongeveer 700 bp fragment, verkregen door behandeling van een recombinantplasmide van pWT 231, dat een gen of een subeenheid daarvan of een equivalent daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 8, 16 of 19 bevat met Sac I, S1-nuclease, E. coli DNA-polymerase I en Hind III; restrictie met Hind III; en ligatie aan met Hind III tot restrictie gebracht, met bacterieel basisch fosfatase behandeld pAT 153.
- 5
- 10 33. Werkwijze volgens conclusie 31 of 32, in wezen zoals hier beschreven.
34. Plasmiderecombinant volgens een of meer van de conclusies 23 - 30, bereid met een werkwijze volgens een of meer van de conclusies 31 - 33.
- 15 35. Cel, omvattend daarin ingebracht een gen of een subeenheid daarvan of een equivalent daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 8, 16 of 19, of een plasmiderecombinant volgens een of meer van de conclusies 23 - 30 of 34.
- 20 36. Cel volgens conclusie 35, welke een E. coli K-12 HB101-cel is.
37. Cel volgens conclusie 35 of 36, in wezen zoals hier beschreven.
- 25 38. Werkwijze voor de bereiding van een cel volgens een of meer van de conclusies 35 - 37, omvattende het inbrengen van een gen of een subeenheid daarvan of een equivalent daarvan volgens een of meer van de conclusies 1 - 8, 16 of 19, of een plasmiderecombinant volgens een of meer van de conclusies 23 - 30 of 34 in een cel.
39. Werkwijze volgens conclusie 38, in wezen zoals hier beschreven.
- 30 40. Cel volgens een of meer van de conclusies 35 - 37, bereid met een werkwijze volgens conclusie 38 of 39.
41. Werkwijze voor de bereiding van een eiwit met eigenschappen die lijken op die van menselijk interferon, waarbij een cel wordt gekweekt volgens een of meer van de conclusies 35 - 37 of 40 en tot expressie gebracht eiwit wordt gewonnen.
- 35

42. Werkwijze volgens conclusie 41, in wezen zoals hier beschreven.

43. Eiwit met eigenschappen, die lijken op die van menselijk interferon, bereid met een werkwijze volgens conclusie 41 of 42.

UCN A A A CGN UCN UCN
 UU UU UU
 G G G

MENSELIJK FS-4 H-Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser

FIBROBLAST

AUG AG^U_C UA^U_C AA^U_C CUN CUN GGN UU^U_C CUN CA^A_G AG^A_G AG^U_C AG^U_C

MUIS

$$\begin{array}{ccccccc}
 & & \text{A} & & \text{A} & & \\
 & \text{UU} & & \text{UU} & & \text{CGN} & \\
 & \text{G} & & \text{G} & & & \\
 & \cdot & & \cdot\cdot & & \cdot & \\
 \text{H-Ile} - & \text{Asn} - & \text{Tyr} - & \text{Lys} - & \text{Gln} - & \text{Leu} - & \text{Gln} - \text{Leu} - \text{Gln} - \text{Glu} - \text{Arg} - \text{Thr} - \text{Asn}
 \end{array}$$

A en B

U U U A A
AUC AA UA AA CA CUN CA CUN CA GA AG ACN AA U
A C C G G G G G G G G C C

.. : .. : . : . : . : .. :

AUG AGC UAC AAC CUG (GEDEDUCEERDE MOGELIJKHEDEN VAN CODERINGS-
OPVOLGING)

AUG AGU UAC AAC CUG

OH 3'-TAC TCG ATG TTG GAC-5' IFIA

OH 3'-TAC TCA ATG TTG GAC-5' IFIB (GEDEDUCEERDE MOGELIJKE PRIMERS)

Fig.1

3' AAG . ATT . GAC . GTT . GGA . AAG . CTT . CGG . AAA . CGA . GAC . CGT . GTT . GTC . CAT . —
 5' UUC . UAA . CUG . CAA . CCU . UUC . GAA . GCC . UUU . GCU . CUG . GCA . CAA . CAG . GUA . —

 CAT . CCG . CTG . TGA . CAA . GCA . CAA . CAG . TTG . TAC . TGG . TTG . TTC . ACA . GAG . —
 GUA . GGC . GAC . ACU . GUU . CGU . GUU . GUC . AAC . AUG . ACC . AAC . AAG . UGU . CUC . —

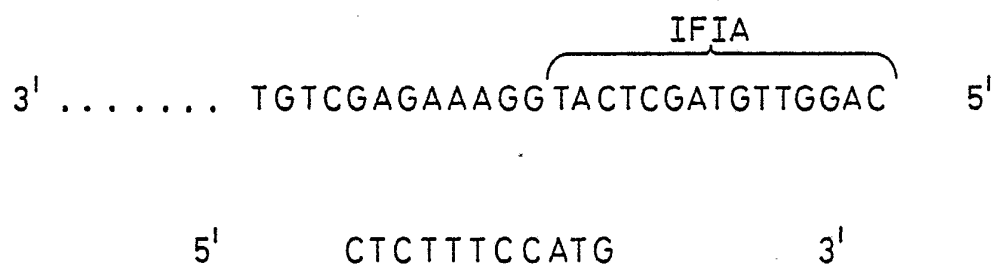
 met thr asn lys cys leu

 GAG . GTT . TAA . CGA . GAG . GAC . AAC . ACG . AAG . AGG . TGA . TGT . CGA . GAA . AGG . — →
 CUC . CAA . AUU . GCU . CUC . CUG . UUG . UGC . UUC . UCC . ACU . ACA . GCU . CUU . UCC . 3'

 leu gln ile ala leu leu leu cys phe ser thr thr ala leu ser

 IFIA
 → TAC . TCG . ATG . TTG . GAC . 5'

Fig.2



IFII

Fig.3

IF III



IF IV



IF V



Fig.4

IF III

5' CT . CTT . TCC . ATG . AGC . TAC . AAC . TTG . CTT . —

mRNA 5' ... CU . CUU . UCC . AUG . AGC . UAC . AAC . UUG . CUU . —

PROTEIN N leu ser met ser tyr asn leu leu —

↓
RIJP POLYPEPTIDE

GGA . TTC . CTA . CAA . AGA . AGC . AGC . —

GGA . UUC . CUA . CAA . AGA . AGC . AGC . —

10

gly phe leu gln arg ser ser —

AAT . TTT . CAG . TGT . CAG . —

AAU . UUU . CAG . UGU . CAG . —

asn phe gln cys gln —

AAG . CTC . CTG . TGG . CAA . TTG . —

AAG . CUC . CUG . UGG . CAA . UUG . —

20

lys leu leu trp gln leu —

AAT . GGG . AGG . CTT . GAA . TAC . —

AAU . GGG . AGG . CUU . GAA . UAC . —

30

asn gly arg leu glu tyr —

TGC . CTC . AAG . GAC . AGG . ATG . —

UGC . CUC . AAG . GAC . AGG . AUG . —

cys leu lys asp arg met —

Fig.5 (1 3)

8100558

5' AAC . TTT . GAC . ATC . CCT . GAG . —
 mRNA 5' AAC . UUU . GAC . AUC . CCU . GAG . —
 N asn phe asp ile pro glu —
 40
IF IV
 GAG . ATT . AAG . CAG . CTG . CAG . CAG . TTC . CAG . AAG . GAG . GAC . GCC . GCA . —
 GAG . AUU . AAG . CAG . CUG . CAG . CAG . UUC . CAG . AAG . GAG . GAC . GCC . GCA . —
 glu ile lys gln leu gln gln phe gln lys glu asp ala ala —
 50
 TTG . ACC . ATC . TAT . GAG . ATG . CTC . CAG . AAC . ATC . TTT . GCT . ATT . TTC . —
 UUG . ACC . AUC . UAU . GAG . AUG . CUC . CAG . AAC . AUC . UUU . GCU . AUU . UUC . —
 leu thr ile tyr glu met leu gln asn ile phe ala ile phe —
 60
 AGA . CAA . GAT . TCA . TCT . AGC . ACT . GGC . TGG . AAT . GAG . ACT . ATT . GTT . —
 AGA . CAA . GAU . UCA . UCU . AGC . ACU . GGC . UGG . AAU . GAG . ACU . AUU . GUU . —
 arg gln asp ser ser ser thr gly trp asn glu thr ile val —
 80
 GAG . AAC . CTC . CTG . GCT . AAT . GTC . TAT . CAT . CAG . ATA . AAC . CAT . CTG . —
 GAG . AAC . CUC . CUG . GCU . AAU . GUC . UAU . CAU . CAG . AUA . AAC . CAU . CUG . —
 glu asn leu leu ala asn val tyr his gln ile asn his leu —
 90
IF V
 AAG . ACA . GTC . CTG . GAA . GAA . AAA . CTG . GAG . AAA . GAA . GAT . TTC . ACC . —
 AAG . ACA . GUC . CUG . GAA . GAA . AAA . CUG . GAG . AAA . GAA . GAU . UUC . ACC . —
 lys thr val leu glu glu lys leu glu lys glu asp phe thr —
 100 110

Fig. 5(2 3)

AGG. GGA. AAA. CTC. ATG. AGC. AGT. CTG. CAC. CTG. AAA. AGA. TAT. TAT. —

AGG. GGA. AAA. CUC. AUG. AGC. AGU. CUG. CAC. CUG. AAA. AGA. UAU. UAU. —

arg gly lys leu met ser ser ¹²⁰ leu his leu lys arg tyr tyr —

GGG. AGG. ATT. CTG. CAT. TAC. CTG. AAG. GCC. AAG. GAG. TAC. AGT. CAC. —

GGG. AGG. AUU. CUG. CAU. UAC. CUG. AAG. GCC. AAG. GAG. UAC. AGU. CAC. —

gly arg ile ¹³⁰ leu his tyr leu lys ala lys glu tyr ser ¹⁴⁰ his —

TGT. GCC. TGG. ACC. ATA. GTC. AGA. GTG. GAA. ATC. CTA. AGG. AAC. TTT. —

UGU. GCC. UGG. ACC. AUA. GUC. AGA. GUG. GAA. AUC. CUA. AGG. AAC. UUU. —

cys ala trp thr ile val arg val glu ¹⁵⁰ ile leu arg asn phe —

TAC. TTC. ATT. AAC. AGA. CTT. ACA. GGT. TAC. CTC. CGA. AAC. TGA. AGA. —

UAC. UUC. AUU. AAC. AGA. CUU. ACA. GGU. UAC. CUC. CGA. AAC. UGA. AGA. —

tyr phe ile ¹⁶⁰ asn arg leu thr gly tyr leu arg ¹⁶⁶ asn —

TCT —

UCU —

Fig.5(3 3)

8100558

CODERINGSSTRENG 5' TTC . TAA . CTG . CAA . CCT . TTC . GAA .—

COMPLEMENTAIRE STRENG 3' AAG . ATT . GAC . GTT . GGA . AAG . CTT .—

GCC . TTT . GCT . CTG . GCA . CAA . CAG . GTA . GTA . GGC . GAC . ACT . GTT . CGT .—

CGG . AAA . CGA . GAC . CGT . GTT . GTC . CAT . CAT . CCG . CTG . TGA . CAA . GCA .—

GTT . GTC . AAC . ATG . ACC . AAC . AAG . TGT . CTC . CTC . CAA . ATT . GCT . CTC .—

CAA . CAG . TTG . TAC . TGG . TTG . TTC . ACA . GAG . GAG . GTT . TAA . CGA . GAG .—

CTG . TTG . TGC . TTC . TCC . ACT . ACA . GCT . CTT . TCC . ATG . AGC . TAC . AAC .—

GAC . AAC . ACG . AAG . AGG . TGA . TGT . CGA . GAA . AGG . TAC . TCG . ATG . TTG .—

TTG . CTT . GGA . TTC . CTA . CAA . AGA . AGC . AGC . AAT . TTT . CAG . TGT . CAG .—

AAC . GAA . CCT . AAG . GAT . GTT . TCT . TCG . TCG . TTA . AAA . GTC . ACA . GTC .—

AAG . CTC . CTG . TGG . CAA . TTG . AAT . GGG . AGG . CTT . GAA . TAC . TGC . CTC .—

TTC . GAG . GAC . ACC . GTT . AAC . TTA . CCC . TCC . GAA . CTT . ATG . ACG . GAG .—

AAG . GAC . AGG . ATG . AAC . TTT . GAC . ATC . CCT . GAG . GAG . ATT . AAG . CAG .—

TTC . CTG . TCC . TAC . TTG . AAA . CTG . TAG . GGA . CTC . CTC . TAA . TTC . GTC .—

CTG . CAG . CAG . TTC . CAG . AAG . GAG . GAC . GCC . GCA . TTG . ACC . ATC . TAT .—

GAC . GTC . GTC . AAG . GTC . TTC . CTC . CTG . CGG . CGT . AAC . TGG . TAG . ATA .—

Fig. 6. (1 2)

GAG . ATG . CTC . CAG . AAC . ATC . TTT . GCT . ATT . TTC . AGA . CAA . GAT . TCA .—
 CTC . TAC . GAG . GTC . TTG . TAG . AAA . CGA . TAA . AAG . TCT . GTT . CTA . AGT .—
 TCT . AGC . ACT . GGC . TGG . AAT . GAG . ACT . ATT . GTT . GAG . AAC . CTC . CTG .—
 AGA . TCG . TGA . CCG . ACC . TTA . CTC . TGA . TAA . CAA . CTC . TTG . GAG . GAC .—
 GCT . AAT . GTC . TAT . CAT . CAG . ATA . AAC . CAT . CTG . AAG . ACA . GTC . CTG .—
 CGA . TTA . CAG . ATA . GTA . GTC . TAT . TTG . GTA . GAC . TTC . TGT . CAG . GAC .—
 GAA . GAA . AAA . CTG . GAG . AAA . GAA . GAT . TTC . ACC . AGG . GGA . AAA . CTC .—
 CTT . CTT . TTT . GAC . CTC . TTT . CTT . CTA . AAG . TGG . TCC . CCT . TTT . GAG .—
 ATG . AGC . AGT . CTG . CAC . CTG . AAA . AGA . TAT . TAT . GGG . AGG . ATT . CTG .—
 TAC . TCG . TCA . GAC . GTG . GAC . TTT . TCT . ATA . ATA . CCC . TCC . TAA . GAC .—
 CAT . TAC . CTG . AAG . GCC . AAG . GAG . TAC . AGT . CAC . TGT . GCC . TGG . ACC .—
 GTA . ATG . GAC . TTC . CGG . TTC . CTC . ATG . TCA . GTG . ACA . CGG . ACC . TGG .—
 ATA . GTC . AGA . GTG . GAA . ATC . CTA . AGG . AAC . TTT . TAC . TTC . ATT . AAC .—
 TAT . CAG . TCT . CAC . CTT . TAG . GAT . TCC . TTG . AAA . ATG . AAG . TAA . TTG .—
 AGA . CTT . ACA . GGT . TAC . CTC . CGA . AAC . TGA . AGA . TCT
 TCT . GAA . TGT . CCA . ATG . GAG . GCT . TTG . ACT . TCT . AGA

Fig.6 (2 2)

8100558

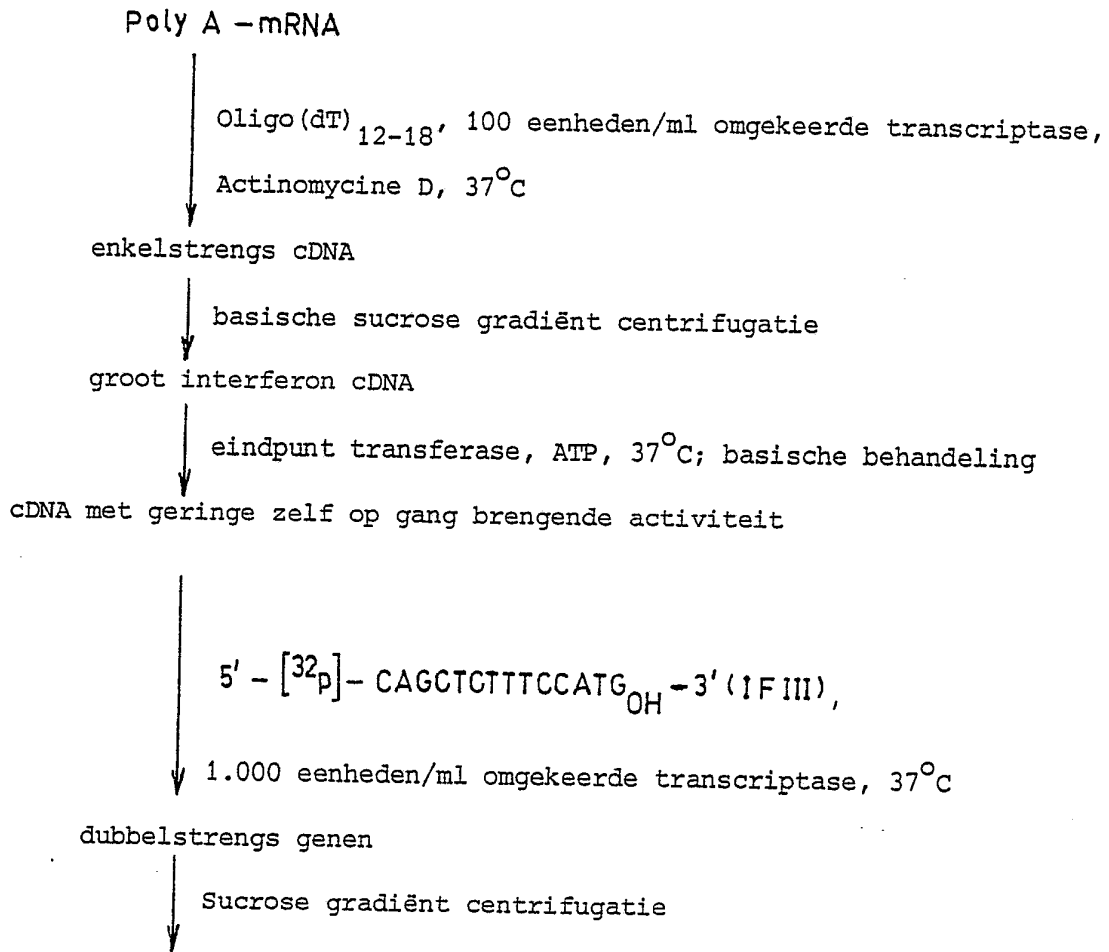


Fig.7(1 2)

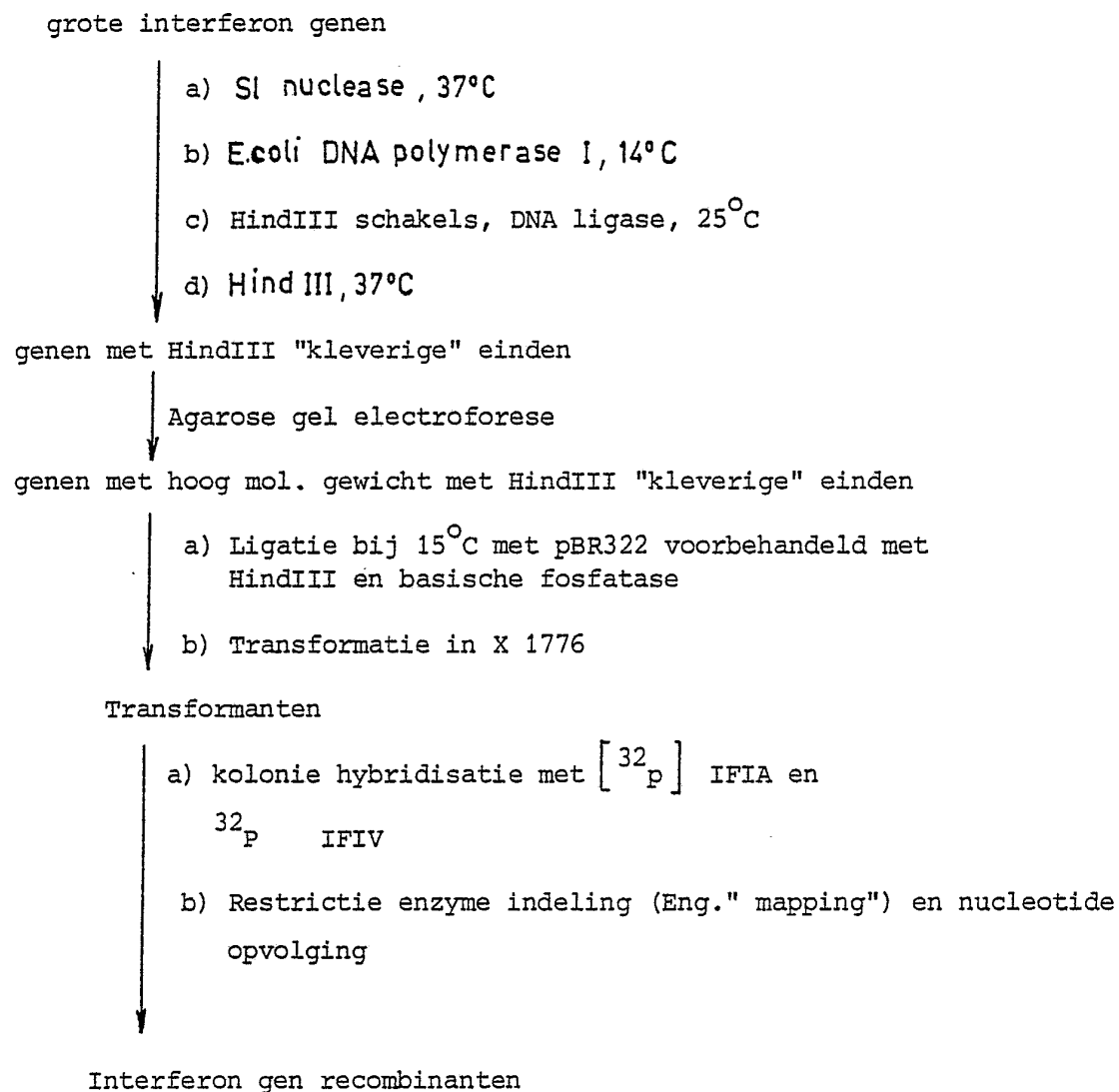
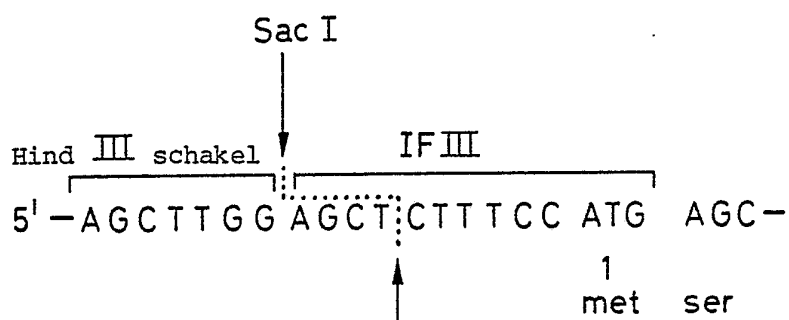


Fig.7 (2 2)



TAC AAC TTG CTT GGA TTC CTA CAA -
 tyr asn leu leu gly phe leu gln
 10

AGA AGC AGC AAT TTT CAG TGT CAG -
 arg ser ser asn phe gln cys gln

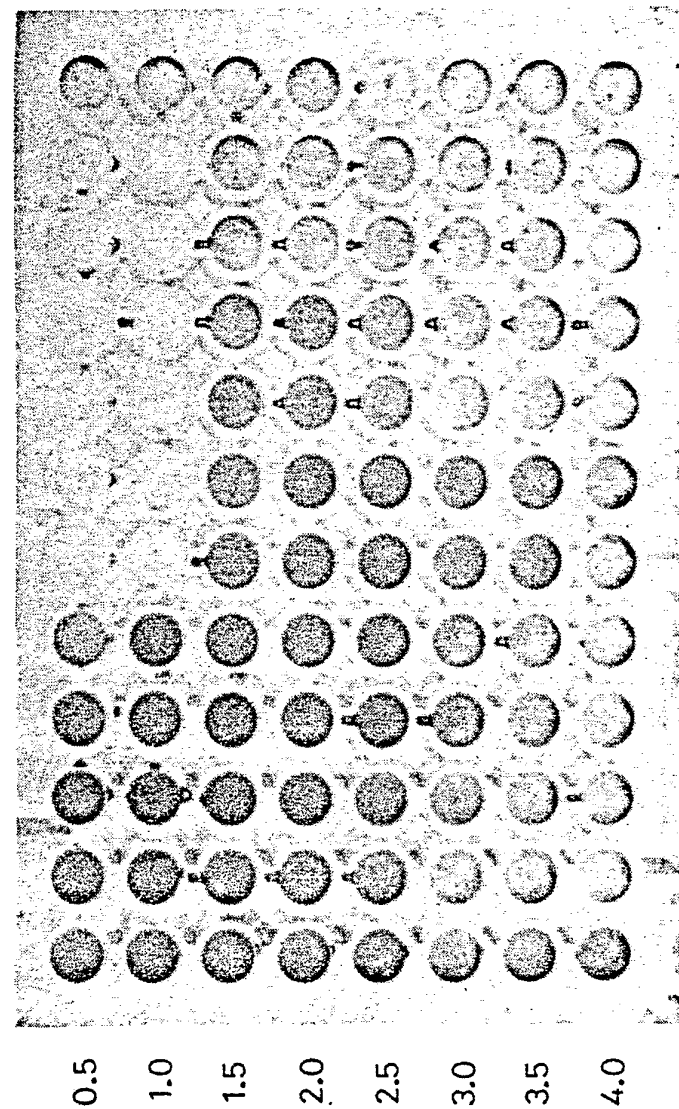
AAG CTC CTG TGG CAA TTG AAT GGG -
 lys leu leu trp gln leu asn gly
 20

AGG CTT GAA TAT TGC
 arg leu glu tyr cys
 30

Fig.8

81 005 58

Veros Std. A Std. B 221 231 + Std. B 231 EMC



verduimend
↓
(log₁₀)

Fig.9

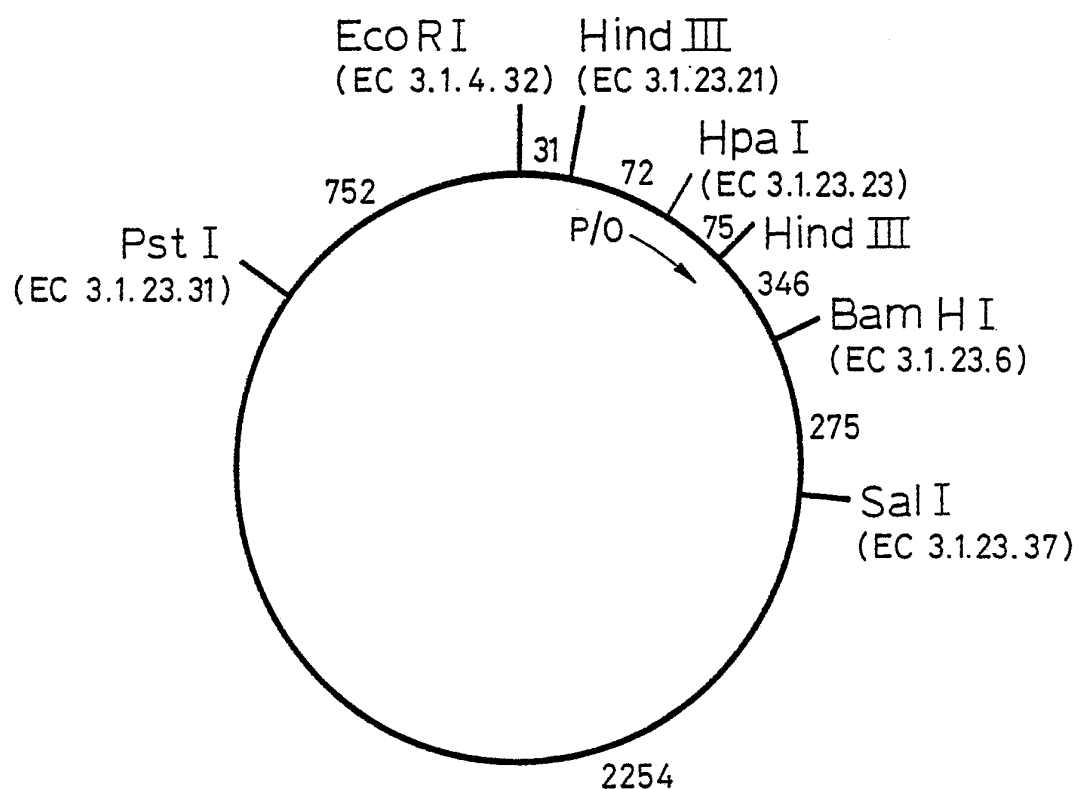


Fig.10

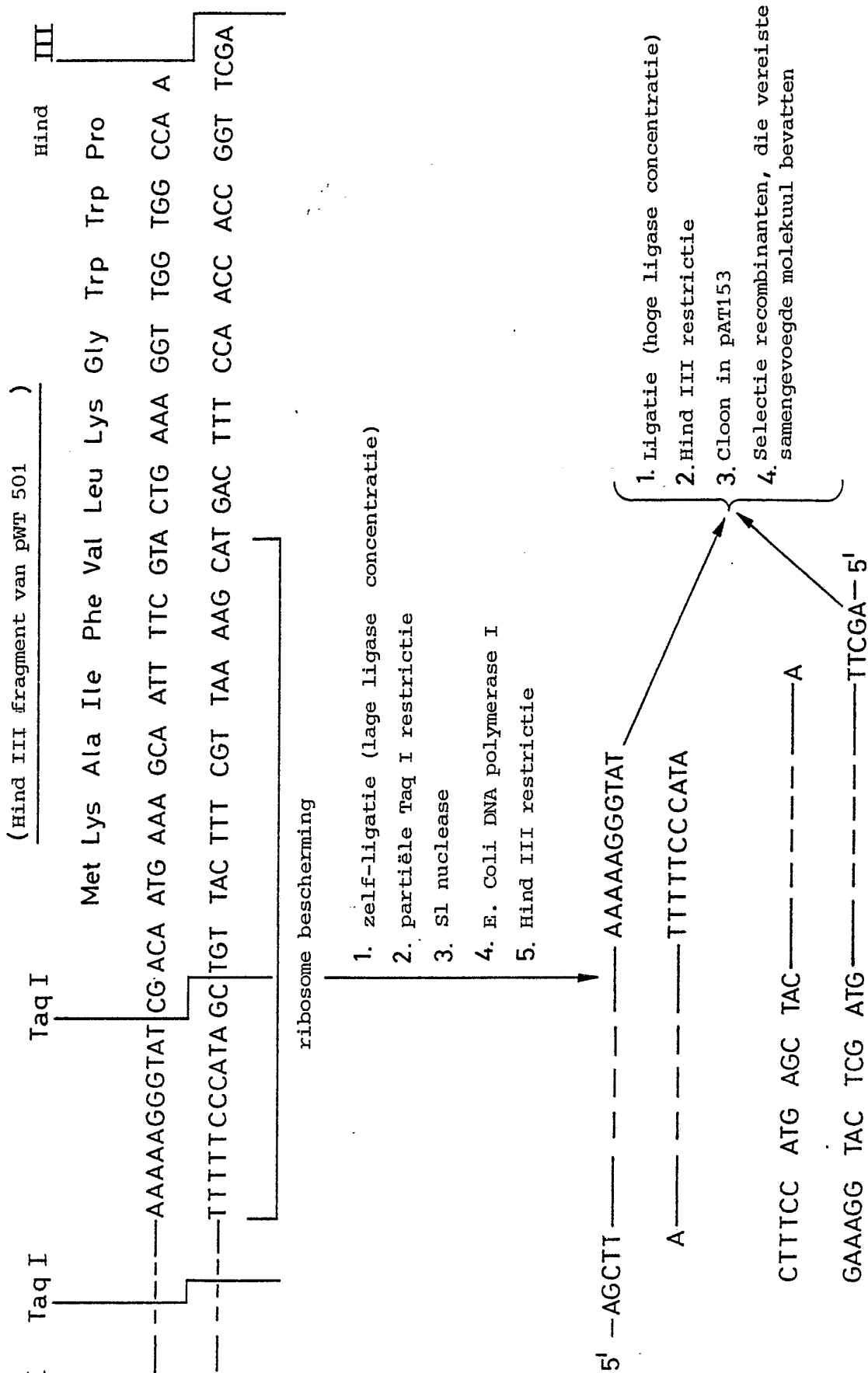
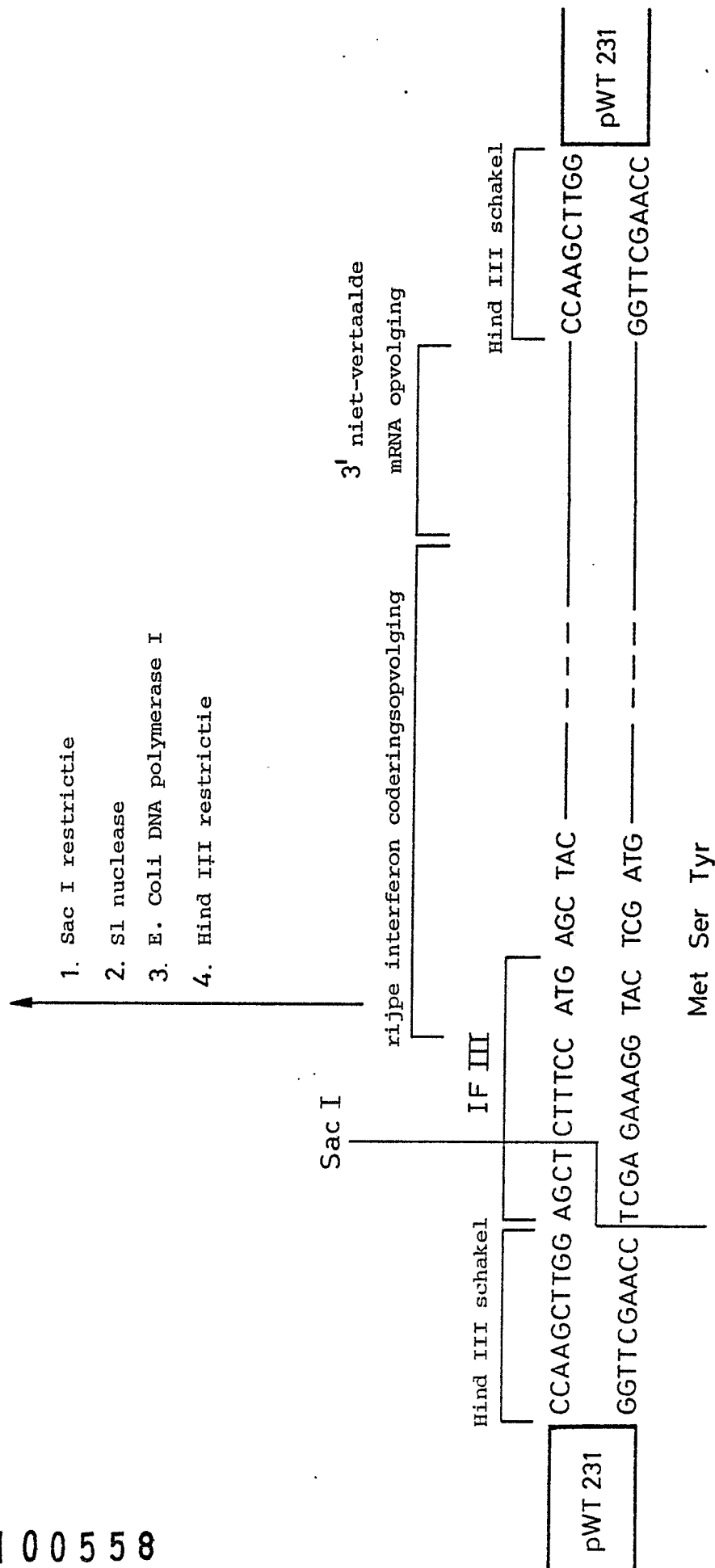


Fig.11(1 3)



(Interferon gen gecloond in pWT 231)

Fig.11 (2 3)

Structuur van vereiste recombinant

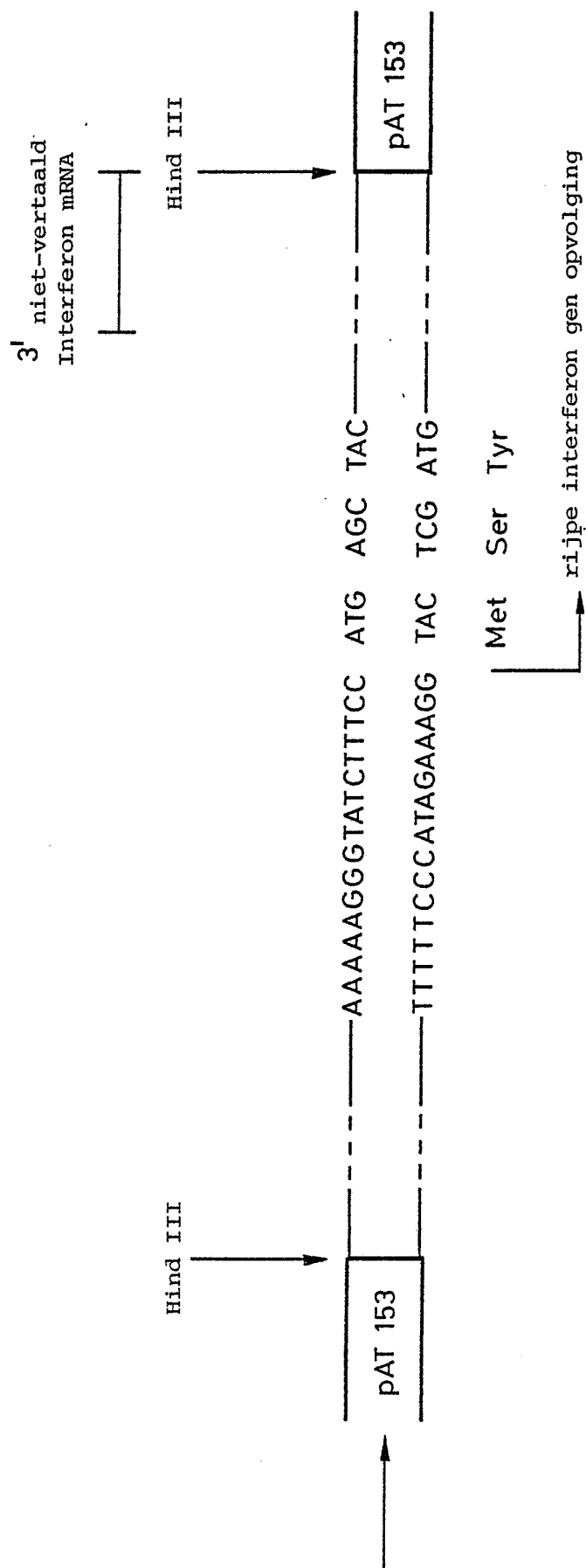
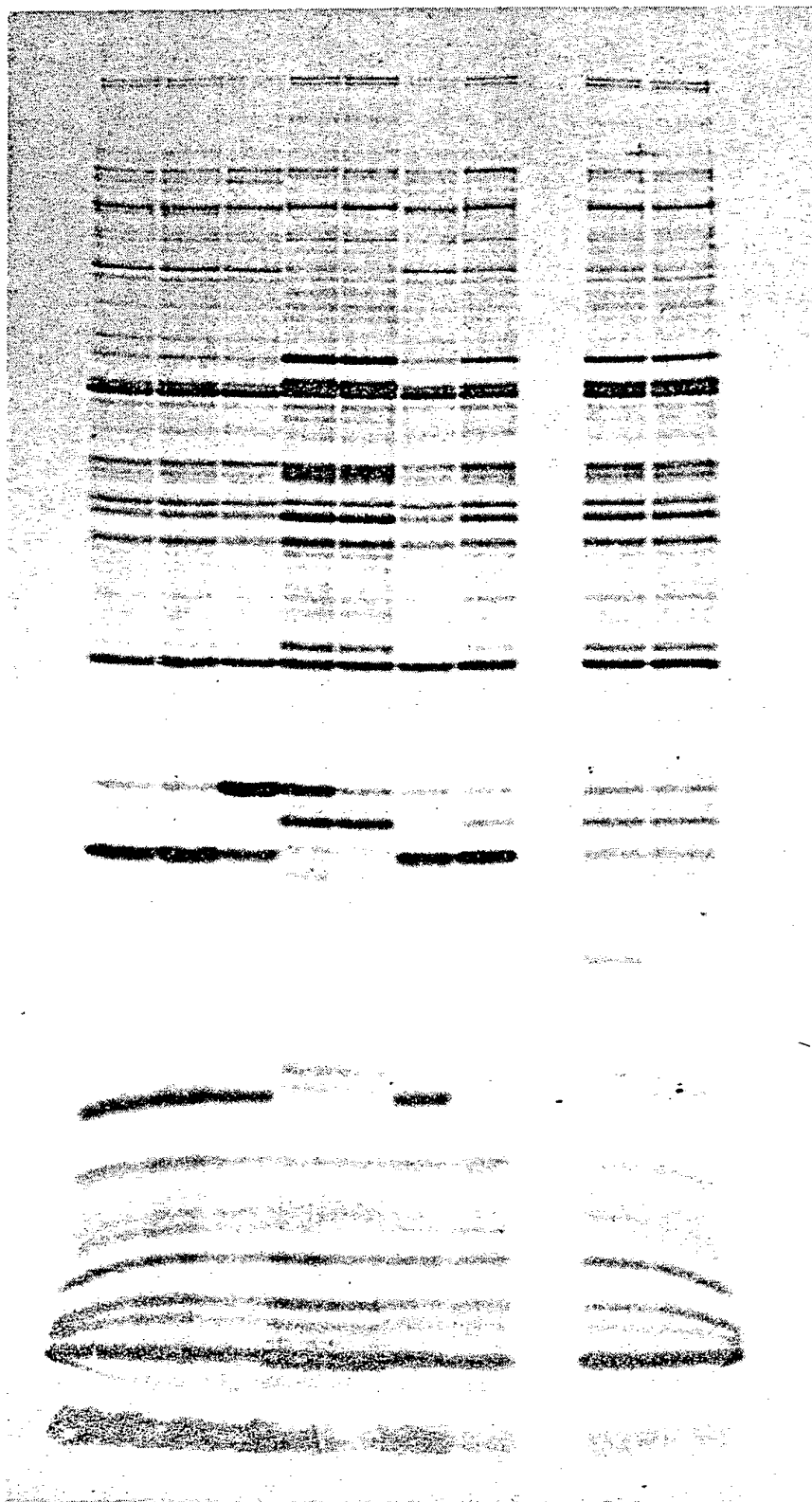


Fig.11 (3 3)

a b c d

f g



◀ 24 KD

(groottes van
interferons)

◀ 19 KD

Fig.12

5' GGC.CAT.ACC.CAT.GGA.GAA.AGG.ACA.TTC.TAA.CTG.CAA.CCT.—
 TTC.GAA.GCC.TTT.GCT.CTG.GCA.CAA.CAG.GTA.GTA.GGC.GAC.ACT.—
 GTT.CGT.GTT.GTC.AAC.ATG.ACC.AAC.AAG.TGT.CTC.CTC.CAA.ATT.—
 GCT.CTC.CTG.TTG.TGC.TTC.TCC.ACT.ACA.GCT.CTT.TCC.ATG.AGC.—
 TAC.AAC.TTG.CTT.GGA.TTC.CTA.CAA.AGA.AGC.AGC.AAT.TTT.CAG.—
 TGT.CAG.AAG.CTC.CTG.TGG.CAA.TTG.AAT.GGG.AGG.CTT.GAA.TAC.—
 TGC.CTC.AAG.GAC.AGG.ATG.AAC.TTT.GAC.ATC.CCT.GAG.GAG.ATT.—
 AAG.CAG.CTG.CAG.CAG.TTC.CAG.AAG.GAG.GAC.GCC.GCA.TTG.ACC.—
 ATC.TAT.GAG.ATG.CTC.CAG.AAC.ATC.TTT.GCT.ATT.TTC.AGA.CAA.—
 GAT.TCA.TCT.AGC.ACT.GGC.TGG.AAT.GAG.ACT.ATT.GTT.GAG.AAC.—
 CTC.CTG.GCT.AAT.GTC.TAT.CAT.CAG.ATA.AAC.CAT.CTG.AAG.ACA.—
 GTC.CTG.GAA.GAA.AAA.CTG.GAG.AAA.GAA.GAT.TTC.ACC.AGG.GGA.—
 AAA.CTC.ATG.AGC.AGT.CTG.CAC.CTG.AAA.AGA.TAT.TAT.GGG.AGG.—
 ATT.CTG.CAT.TAC.CTG.AAG.GCC.AAG.GAG.TAC.AGT.CAC.TGT.GCC.—
 TGG.ACC.ATA.GTC.AGA.GTG.GAA.ATC.CTA.AGG.AAC.TTT.TAC.TTC.—
 ATT.AAC.AGA.CTT.ACA.GGT.TAC.CTC.CGA.AAC.TGA.AGA.TCT.CCT.—
 AGC.CTG.TGC.CTC.TGG.GAC.TGG.ACA.ATT.GCT.TCA.AGC.ATT.CTT.—
 CAA.CCA.GCA.GAT.GCT.GTT.TAA.GTG.ACT.GAT.GGC.TAA.TGT.ACT.—
 GCA.TAT.GAA.AGG.ACA.CTA.GAA.GAT.TTT.GAA.ATT.TTT.ATT.AAA.—
 TTA.TGA.GTT.ATT.TTT.ATT.TAT.TTA.AAT.TTT.ATT.TTG.GAA.AAT.—
 AAA.TTA.TTT.TTG.GTG.CAA.AAG.TCA.ACA.TGG.CAG.TTT.TAA.TTT.—
 CGA.TTT.GAT.TTA.TAT.AAC.CA...3'

Fig.13

8100558

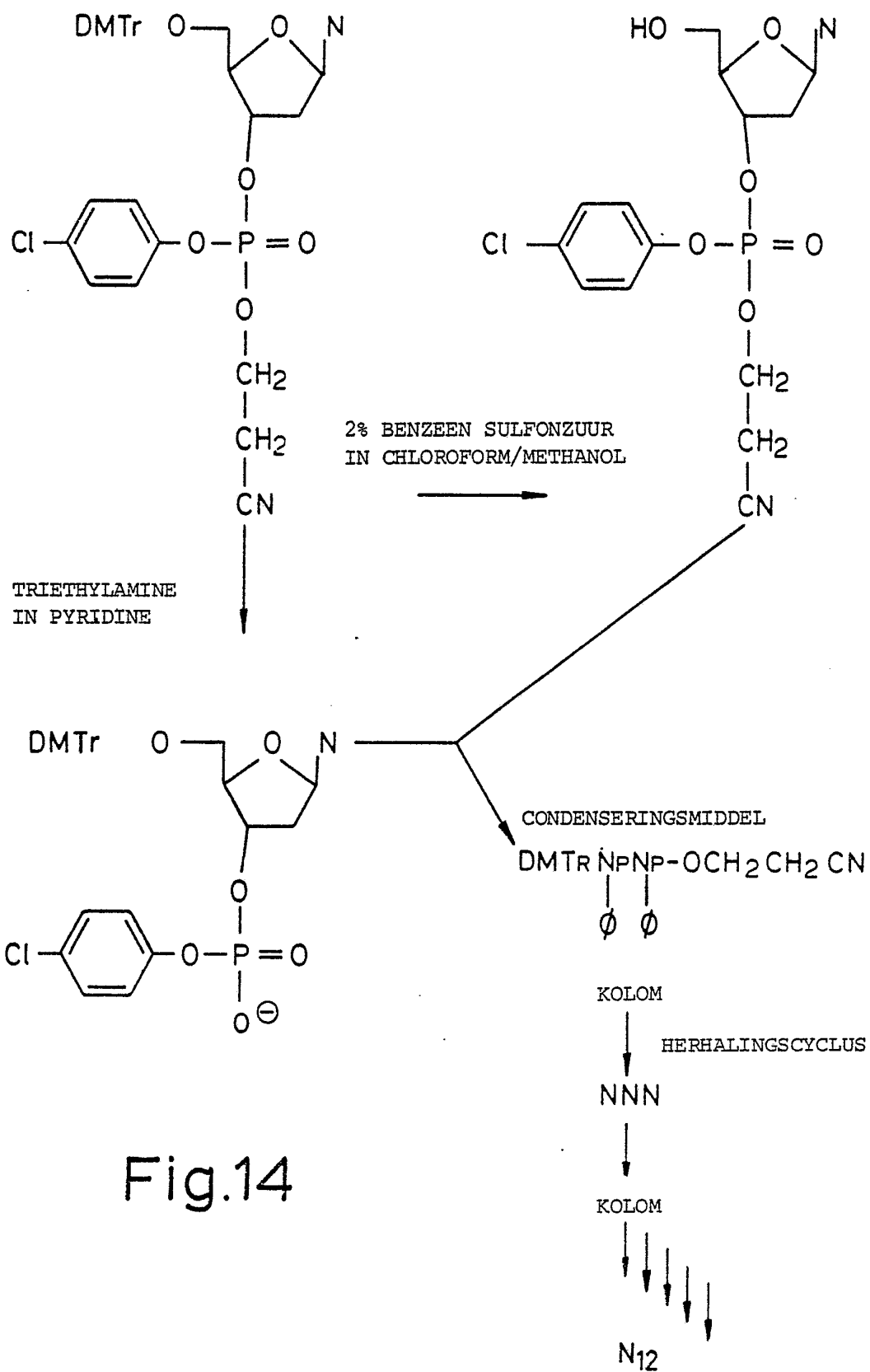


Fig.14