

(12) Ausschließungspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

PATENTSCHRIFT

(19) **DD** (11) **276 493 A5**4(51) C 12 N 15/00
C 12 P 21/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N / 323 501 0
(31) P3607835.2(22) 09.03.87
(32) 10.03.86(44) 28.02.90
(33) DE

(71) siehe (73)

(72) Hauptmann, Rudolf, Dr.; Svetly, Peter, Prof. Dr.; Meindl, Peter, Dr.; Adolf, Günther, Dr.; Falkner, Edgar, Dr.; Bodo, Gerhard, Prof. Dr.; Maurer-Fogy, Ingrid, Dr., AT

(73) Boehringer Ingelheim International, GmbH, Ingelheim, DE

(74) Internationales Patentbüro Berlin, Wallstraße 23/24, Berlin, 1020, DD

(54) Verfahren zur Herstellung eines Hybridinterferons

(55) Verfahren, Herstellung, Hybridinterferon, α -Interferon, Wirtsorganismus, Vektor, genetisch, Information, isoliert
 (57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines Hybridinterferons, bestehend aus einem Teil eines α -Interferons und einem Teil eines ω -Interferons, von dessen N-terminalen Met- oder N-Formyl-Met-Derivaten und, falls die Peptidsequenz des Hybridinterferons eine Glykosylierungsstelle enthält, von dessen N-glykosylierten Derivaten, dadurch gekennzeichnet, daß ein geeigneter bakterieller Wirtsorganismus mit einem Vektor, der die genetische Information für diese Hybridinterferone enthält, transformiert wird, diese Information exprimiert werden und das so erhaltene Hybridinterferon aus diesem Wirtsorganismus isoliert wird.

in der

X für Gly oder Glu steht, aufweist.

5. Verfahren gemäß Anspruch 3, **dadurch gekennzeichnet**, daß das hergestellte IFN- ω 1/ α 2(BglII) die Formel

	5	10	15
Cys	Asp	Leu	Pro
Gln	Asn	His	Gly
Leu	Leu	Ser	Arg
Asn	Thr	Leu	
20	25	30	
Val	Leu	Leu	His
Gln	Met	Arg	Arg
Ile	Ser	Pro	Phe
Leu	Cys	Leu	
35	40	45	
Lys	Asp	Arg	Arg
Asp	Phe	Arg	Phe
Pro	Gln	Glu	Met
Val	Lys	Gly	
50	55	60	
Ser	Gln	Leu	Gln
Lys	Ala	His	Val
Met	Ser	Val	Leu
His	Glu	Met	
65	70	75	
Leu	Gln	Gln	Ile
Phe	Asn	Leu	Phe
Ser	Thr	Lys	Asp
Ser	Ser	Ala	
80	85	90	
Ala	Trp	Asp	Glu
Thr	Leu	Leu	Asp
Lys	Phe	Tyr	Thr
Glu	Leu	Tyr	
95	100	105	
Gln	Gln	Leu	Asn
Asp	Leu	Glu	Ala
Cys	Val	Ile	Gln
Gly	Val	Gly	
110	115	120	
Val	Thr	Glu	Thr
Pro	Leu	Met	Lys
Glu	Asp	Ser	Ile
Leu	Ala	Val	
125	130	135	
Arg	Lys	Tyr	Phe
Gln	Arg	Ile	Thr
Leu	Tyr	Leu	Lys
Glu	Lys	Lys	
140	145	150	
Tyr	Ser	Pro	Cys
Ala	Trp	Glu	Val
Val	Arg	Ala	Glu
Ile	Met	Arg	
155	160	165	
Ser	Phe	Ser	Leu
Ser	Thr	Asn	Leu
Gln	Glu	Ser	Leu
Arg	Ser	Lys	
170			
Glu			

aufweist.

6. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 5, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Wirt E.coli HB 101 transformiert mit einem Expressionsplasmid, welches eine codierende Sequenz für die neuen Hybridinterferone enthält, verwendet wird.
7. Verfahren gemäß Anspruch 6, **dadurch gekennzeichnet**, daß das verwendete Expressionsplasmid die für IFN- α 2/ ω 1(BglII) codierende Sequenz der Formel ,

```

ATG TGT GAT CTG CCT CAA ACC CAC AGC CTG GGT AGC AGG AGG ACC 45
TTG ATG CTC CTG GCA CAG ATG AGG AGA ATC TCT CTT TTC TCC TGC 90
TTG AAG GAC AGA CGT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GGC 135
AAC CAG TTC CAA AAG GCT GAA ACC ATC CCT GTC CTC CAT GAG ATG 180
ATC CAG CAG ATC TTC AGC CTC TTC CAC ACA GAG CGC TCC TCT GCT 225
GCC TGG AAC ATG ACC CTC CTA GAC CAA CTC CAC ACT GGA CTT CAT 270
CAG CAA CTG CAA CAC CTG GAG ACC TGC TTG CTG CAG GTA GTG GGA 315
GAA GGA GAA TCT GCT GYG GCA ATT AGC AGC CCT GCA CTG ACC TTG 360
AGG AGG TAC TTC CAG GGA ATC CGT GTC TAC CTG AAA GAG AAG AAA 405
TAC AGC GAC TGT GCC TGG GAA GTT GTC AGA ATG GAA ATC ATG AAA 450
TCC TTG TTC TTA TCA ACA AAC ATG CAA GAA AGA CTG AGA AGT AAA 495
GAT AGA GAC CTG GGC TCA TCT TGA 519

```

in der

Y für das Nukleotid G oder A steht, oder

die für IFN-omega1/alpha2(BglII) codierende Sequenz der Formel

```

ATG TGT GAT CTG CCT CAG AAC CAT GGC CTA CTT AGC AGG AAC ACC 45
TTG GTG CTT CTG CAC CAA ATG AGG AGA ATC TCC CCT TTC TTG TGT 90
CTC AAG GAC AGA AGA GAC TTC AGG TTC CCC CAG GAG ATG GTA AAA 135
GGG AGC CAG TTG CAG AAG GCC CAT GTC ATG TCT GTC CTC CAT GAG 180
ATG CTG CAG CAG ATC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT 225
GCT GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTC 270
TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG GGG GTG 315
GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG GCT 360
GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG 405
AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG 450
AGA TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT 495
AAG GAA TGA 504

```

und dessen degenerierte Varianten enthält.

8. Verfahren gemäß den Ansprüchen 6 und 7, **gekennzeichnet** dadurch, daß das verwendete Expressionsplasmid zusätzlich die für die Expression erforderlichen Replikon- und Kontrollsequenzen und gegebenenfalls einen par-Lokus enthält.
9. Verfahren gemäß Anspruch 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß das verwendete Expressionsplasmid die für die Expression erforderlichen Replikon- und Kontrollsequenzen des Plasmids pER 103 enthält, welche die Formel

```

5' AATTCACGCTGATCGCTAAACATTTGTGCAAAAAGAGGGTTGACTTTGCCTTC
3' GTGCGACTAGCGATTTTGTAAACACGTTTTTCTCCCAACTGAAACGGAAG

```

K————Promotor————

```

GCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCAACGGTAAGGAGGTTTAAGCT
CGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGTTGCCATTCTCCAAATTCTGA

```

—Promotor/Operator—*mRNA-Start—RBS—*Link—

TAAAGATGTGT-----

ATTTCTACACACTAG--

-er-*Gen-->

aufweisen, oder eine die Trp-Promotor-Aktivität erhaltene Modifikation.

10. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der par-Lokus aus dem Plasmid pPM31 stammt und die Formel,

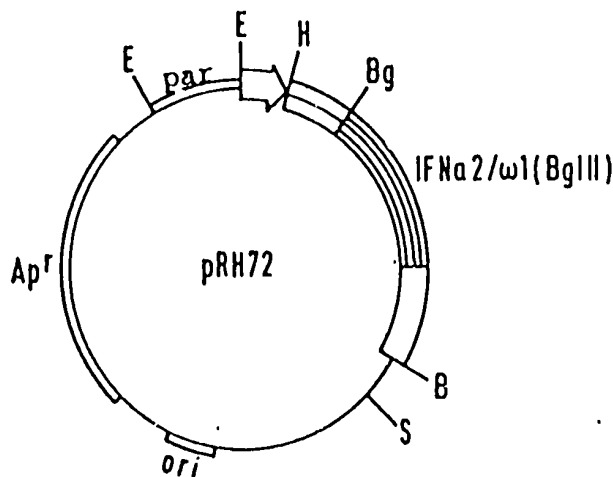
GAATTCCGAC	AGTAAGACGG	GTAAGCCTGT	TGATGATACC	GCTGCCTTAC	50
TGGGTGCATT	AGCCAGTCTG	AATGACCTGT	CACGGGATAA	TCCGAAGTGG	100
TCAGACTGGA	AAATCAGAGG	GCAGGAACTG	CTGAACAGCA	AAAAGTCAGA	150
TAGCACCACA	TAGCAGACCC	GCCATAAAAC	GCCCTGAGAA	<u>Z</u> CCGTGACGG	200
GCTTTTCTTG	TATTATGGGT	AGTTTCCTTG	CATGAATCCA	TAAAAGGCGC	250
CTGTAGTGCC	ATTTACCCCC	ATTCAGTGCC	AGAGCCGTGA	GCGCAGCGAA	300
CTGAATGTCA	CGAAAAAGAC	A <u>W</u> CGACTCAG	GTGCCTGATG	GTCGGAGACA	350
AAAGGAATAT	TCAGCGATTT	GCCCGAGGAA	TTC		383

in der

Z das Nukleotid G oder C und

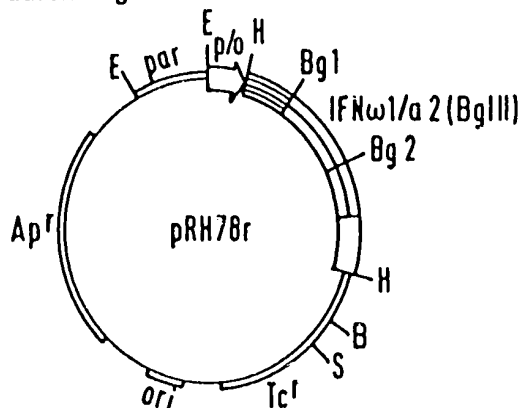
W das Nukleotid G oder kein Nukleotid bedeuten, aufweist, und dessen degenerierte Varianten.

11. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Expressionsplasmid das Plasmid pRH72 verwendet wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß im Plasmid pAT 153 das BamH 1-Pst 1-Fragment durch das BamH 1-Pst I-Fragment des Plasmids parpER33 ersetzt ist, und durch folgende Restriktionskarte



charakterisiert ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Expressionsplasmid das Plasmid pRH78r verwendet wird, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß in das mit Bgl II-linearisierte Plasmid pRH77 das 263bp lange Sph I-Bgl II-Fragment des Plasmids parpATER33 eingesetzt ist, und durch folgende Restriktionskarte



charakterisiert ist.

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß der Wirtsorganismus ein Prokaryot ist.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß als Prokaryot ein Stamm von E. coli HB 101 verwendet wird.

Hierzu 9 Seiten Zeichnungen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von neuen Hybridinterferonen. Die erfindungsgemäß hergestellten Hybridinterferone werden angewandt als Arzneimittel und zur Immunisierung von Versuchstieren bei der Herstellung von Antikörpern, welche zur Reinigung von α - und omega-Interferonen geeignet sind.

Charakteristik des bekannten Standes der Technik

In Nucleic Acids Res. 13, 4739-4749 (1985) (siehe auch EP-A-0 179 204) wird eine neue Klasse von Typ I Interferonen beschrieben, welche als omega-Interferone bezeichnet werden, die für die kodierende DNA-Sequenzen, Plasmide, die diese DNA-Sequenzen enthalten und die neuen Interferone produzierende Organismen.

Bei der Herstellung von größeren Versuchsmengen der neuen omega-Interferone mittels den in den oben erwähnten Publikationen beschriebenen Expressionsplasmiden, z. B. mit pRHWII oder pRHW 12 jeweils transformiert in E. coli HB 101, zeigte es sich jedoch, daß es wünschenswert wäre, die erforderliche nachfolgende Reinigung der exprimierten neuen Interferone zu verbessern sowie die Expression der neuen omega-Interferone zu steigern.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist die Bereitstellung eines Verfahrens zur Herstellung von neuen Hybridinterferonen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein einfaches und wirtschaftliches Herstellungsverfahren für Hybrid-Interferone aufzufinden.

Überraschenderweise wurde nun gefunden, daß die vorstehend erwähnten Unzulänglichkeiten mit Hilfe von neuen Hybridinterferonen, bestehend aus einem Teil eines α -Interferons und einem Teil eines omega-Interferons behoben werden. Die neuen Hybridinterferone, deren N-terminale Met- oder N-Formyl-Met-Derivate sind, falls die Peptidsequenz des Hybridinterferons eine Glykosylierungsstelle enthält, deren N-glykosylierte Derivate weisen teilweise überlegene pharmakologische Eigenschaften aus, diese sind jedoch insbesondere zur Herstellung von neuen monoklonalen Antikörpern, welche zur Reinigung von α - und omega-Interferonen geeignet sind, verwendbar.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind somit neue BglII-Hybridinterferone der Formel,



in der

BglII die gemeine BglII-Restriktionsstelle der $\alpha 1$, $\alpha 2$ - und omega1-Interferone,

R_1 die Peptidsequenz eines $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Interferons, die durch die DNA-Sequenz dieser Interferone vor der BglII-Schnittstelle kodiert wird, und R_2 die Peptidsequenz eines omega1-Interferons, die durch die DNA-Sequenz dieses Interferons nach der BglII-Schnittstelle kodiert wird, oder R_1 die Peptidsequenz eines omega1-Interferons, die durch die DNA-Sequenz dieses Interferons vor der BglII-Schnittstelle kodiert wird, und R_2 die Peptidsequenz eines $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Interferons, die durch die DNA-Sequenz dieser Interferone nach der BglII-Schnittstelle kodiert wird, bedeuten, deren N-terminale Met- oder N-Formyl-Met-Derivate und, falls die Peptidsequenz des Hybridinterferons eine Glykosylierungsstelle enthält, deren N-glykosylierte Derivate, deren Verwendung als Arzneimittel und als Zwischenprodukte zur Immunisierung von Versuchstieren, die für diese Hybridinterferone kodierende DNA-Sequenzen und Verfahren zu ihrer Herstellung, neue monoklonale Antikörper und deren Verwendung zur Reinigung von α - und omega-Interferonen, die die sezernierende Hybridzelllinien und Verfahren zu ihrer Herstellung, ein neues Reinigungsverfahren für α - und omega-Interferone mit Hilfe einer neuen Antikörper-Affinitätsäule, die oben erwähnten neuen monoklonalen Antikörper enthaltend, und Verfahren zu ihrer Herstellung, neue Plasmide zur Verbesserung der Expression der omega-Interferone und neue Zwischenplasmide zur Herstellung der neuen Plasmide sowie Verfahren zu ihrer Herstellung.

Erfindungsgemäß wird zur Herstellung der vorstehend genannten Gegenstände wie folgt verfahren:

Das erste Ziel der vorliegenden Erfindung ist, die Reinigung der omega-Interferone zu verbessern, insbesondere da es bisher nicht gelang, eine entsprechende Anti-omega-Interferon-Antikörper-Affinitätsäule nach bekannten Methoden herzustellen. Einen Ausweg aus dieser Situation stellen die neuen Hybridinterferone der vorliegenden Erfindung dar, welche aus einem Teil eines α -Interferons, vorzugsweise aus einem Teil eines $\alpha 1$ - oder $\alpha 2$ -Interferons, z. B. des IFN- $\alpha 2$ (Arg) (siehe EP-A-0.095.702), und einem Teil eines omega-Interferons, vorzugsweise aus einem Teil eines omega1(Glu)- oder omega1(Gly)-Interferons (siehe EP-A-0.170.204), aufgebaut sind. Hierbei erfolgt beispielsweise beim IFN- $\alpha 2$ (Arg) und IFN-omega1 die Verknüpfung der für die entsprechenden Teile kodierende DNA-Sequenzen über die BglII-Schnittstelle, die sich in den Positionen 191-196 in beiden

Genen befindet. Hierbei muß eine gegebenenfalls vorhandene Lücke in das Peptid von Aminosäure 1 bis 66 eines α -Interferons, z. B. die Lücke für die Aminosäure Nr. 45 des IFN- α 2(Arg), mitgezählt werden, damit die Sequenz beider Gene miteinander verglichen werden können, wie aus der nachfolgenden Abbildung hervorgeht (einschließlich des N-terminalen Met-Restes, welcher nach der bakteriellen Proteinsynthese meistens wieder abgespalten wird):

5					10					15					
Met	Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Thr	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Arg	Arg	Thr	
ATG	TGT	GAT	CTG	CCT	CAA	ACC	CAC	AGC	CTG	GGT	AGC	AGG	AGG	ACC	45
Met	Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Asn	His	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Asn	Thr	
ATG	TGT	GAT	CTG	CCT	CAG	AAC	CAT	GGC	CTA	CTT	AGC	AGG	AAC	ACC	45
20					15					30					
Leu	Met	Leu	Leu	Ala	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Cys	
TTG	ATG	CTC	CTG	GCA	CAG	ATG	AGG	AGA	ATC	TCT	CTT	TTC	TCC	TGC	90
Leu	Val	Leu	Leu	His	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Pro	Phe	Leu	Cys	
TTG	GTG	CTT	CTG	CAC	CAA	ATG	AGG	AGA	ATC	TCC	CCT	TTC	TTG	TGT	90
35					40					45					
Leu	Lys	Asp	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Phe	Pro	Gln	Glu	Glu	Phe	...	
TTG	AAG	GAC	AGA	CGT	GAC	TTT	GGA	TTT	CCC	CAG	GAG	GAG	TTT	...	135
Leu	Lys	Asp	Arg	Arg	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro	Gln	Glu	Met	Val	Lys	
CTC	AAG	GAC	AGA	AGA	GAC	TTC	AGG	TTC	CCC	CAG	GAG	ATG	GTA	AAA	135
50					55					60					
Gly	Asn	Gln	Phe	Gln	Lys	Ala	Glu	Thr	Ile	Pro	Val	Leu	His	Glu	
GGC	AAC	CAG	TTC	CAA	AAG	GCT	GAA	ACC	ATC	CCT	GTC	CTC	CAT	GAG	180
Gly	Ser	Gln	Leu	Gln	Lys	Ala	His	Val	Met	Ser	Val	Leu	His	Glu	
GGG	AGC	CAG	TTG	CAG	AAG	GCC	CAT	GTC	ATG	TCT	GTC	CTC	CAT	GAG	180
65					70					75					
Met	Ile	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser	Ser	
ATG	ATC	CAG	<u>CAG</u>	<u>ATC</u>	<u>TTC</u>	AAT	CTC	TTC	AGC	ACA	AAG	GAC	TCA	TCT	225
Met	Leu	Gln	Gln	Ile	Phe	Ser	Leu	Phe	His	Thr	Glu	Arg	Ser	Ser	
ATG	CTG	CAG	<u>CAG</u>	<u>ATC</u>	<u>TTC</u>	AGC	CTC	TTC	CAC	ACA	GAG	CGC	TCC	TCT	225
80					85					90					
Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Thr	Leu	Leu	Asp	Lys	Phe	Tyr	Thr	Glu	Leu	
GCT	GCT	TGG	GAT	GAG	ACC	CTC	CTA	GAC	AAA	TTC	TAC	ACT	GAA	CTC	270
Ala	Ala	Trp	Asn	Met	Thr	Leu	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Thr	Gly	Leu	
GCT	GCC	TGG	AAC	ATG	ACC	CTC	CTA	GAC	CAA	CTC	CAC	ACT	GGA	CTT	270

95	100	105
Tyr Gln Gln Leu Asn Asp Leu Glu Ala Cys Val Ile Gln Gly Val		
TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG ATA CAG GGG GTG	315	
His Gln Gln Leu Gln His Leu Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val		
CAT CAG CAA CTG CAA CAC CTG GAG ACC TGC TTG CTG CAG GTA GTG	315	

110	115	120
Gly Val Thr Glu Thr Pro Leu Met Lys Glu Asp Ser Ile Leu Ala		
GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG GCT	360	
Gly Glu Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ile Ser Ser Pro Ala Leu Thr		
GGA GAA GGA GAA TCT GCT GGG GCA ATT AGC AGC CCT GCA CTG ACC	360	

125	130	135
Val Arg Lys Tyr Phe Gln Arg Ile Thr Leu Tyr Leu Lys Glu Lys		
GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG	405	
Leu Arg Arg Tyr Phe Gln Gly Ile Arg Val Tyr Leu Lys Glu Lys		
TTG AGG AGG TAC TTC CAG GGA ATC CGT GTC TAC CTG AAA GAG AAG	405	

140	145	150
Lys Tyr Ser Pro Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Ala Glu Ile Met		
AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG	450	
Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Met Glu Ile Met		
AAA TAC AGC GAC TGT GCC TGG GAA GTT GTC AGA ATG GAA ATC ATG	450	

155	160	165
Arg Ser Phe Ser Leu Ser Thr Asn Leu Gln Glu Ser Leu Arg Ser		
<u>AGA</u> <u>TCT</u> <u>TTT</u> TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT	495	
Lys Ser Leu Phe Leu Ser Thr Asn Met Gln Glu Arg Leu Arg Ser		
AAA TCC TTG TTC TTA TCA ACA AAC ATG CAA GAA AGA CTG AGA AGT	495	

170	
Lys Glu	
AAG GAA TGA	504
Lys Asp Arg Asp Leu Gly Ser Ser	
AAA GAT AGA GAC CTG GGC TCA TCT TGA	522

In der obigen Abbildung stellt in jeder Doppelreihe die erste Reihe die entsprechenden Sequenzen des IFN- α 2(Arg) und die zweite Reihe die des omega1-Interferons dar, hierbei befindet sich in den Nukleotidpositionen 191–196 die gemeinsame BglII-Schnittstelle für beide Gene – das IFN- α 2(Arg)-Gen weist an der Nukleotidposition 451–456 eine zweite BglII-Schnittstelle auf. Ferner enthalten die nachfolgenden nicht maßstabgerechten Darstellungen der einzelnen Plasmide nur die wesentlichen Sequenzen und Restriktionsenzymkennungsstellen. Hierbei wurden folgenden Abkürzungen benutzt:

Restriktionsenzymkennungssequenzen:

B: BamHI, Bg: BglII, Bgl: 1. BglII-Stelle im IFN- α 2(Arg)-Gen, Bg2: 2. BglII-Stelle im IFN- α 2(Arg)-Gen,

E: EcoRI, H: HindIII, N: NcoI, P: PstI, S: SphI

p/o: Tryptophan Promotor/Operator (*Serratia marcescens*) mit anschließender Shine-Dalgarno Sequenz (ribosomale Bindungsstelle)

par: partition Lokus aus dem Plasmid pPM3I

ori: Replikationsursprung

Ap': Ampicillin Resistenzgen

Tc': Tetracyclin Resistenzgen

Tc*: Tetracyclin sensitiv

kb: 1000 Basenpaare

Des weiteren sind in der vorliegenden Anmeldung folgende Figuren enthalten:

Fig. 1: Konstruktionsschema für parpATER33

Fig. 2: Konstruktionsschema für pRHW 14

Fig. 3: Autoradiogramm von ³⁵S markierten Proteinen aus Maxizellen (E. coli CSR 603)

Fig. 4: Konstruktionsschema für pRH72

Fig. 5: Konstruktionsschema für pRH78r und pRH78f

Fig. 6: MONO-S Chromatogramm von IFN-omega1/alpha2(BglII)

AUFS = Absorption units full scale

Fig. 7: Gelpermeations-HPLC von IFN-omega1/alpha2 (BglII)

Fig. 8: MONO-S Chromatogramm von IFN-omega1

Fig. 9: Reverse Phase HPLC von IFN-omega1

Die neuen BglII-Hybridinterferone und deren N-glykolysierte Derivate bestehen also entweder aus den Aminosäuren 1-66 eines alpha1- oder alpha2-Interferons, vorzugsweise aus den Aminosäuren 1-65 des IFN-alpha2(Arg), und den Aminosäuren 67 bis 173 eines omega1-Interferons oder aus den Aminosäuren 1 bis 66 des omega1-Interferons und den Aminosäuren 67 bis 167 eines alpha1- oder alpha2-Interferons, vorzugsweise aus den Aminosäuren 66 bis 166 des IFN-alpha2(Arg), wobei der N-terminale Met-Rest nach der bakteriellen Proteinsynthese meistens wieder abgespalten wird.

Überraschenderweise werden die neuen Hybridinterferone von Anti-IFN-alpha-Antikörpern erkannt. Dadurch wird die Reinigung der neuen Hybridinterferone mittels literaturbekannter Anti-IFN-alpha-Antikörpern (siehe beispielsweise EP-A-0.119.476) möglich. Mit einem so erhaltenen reinen neuen Hybridinterferon kann dann durch Immunisierung eines Versuchstieres wie BALB/c-Mäusen die Bildung des entsprechenden Antikörpers induziert werden. Diese neuen Antikörper erkennen nicht nur die neuen Hybridinterferone, sondern überraschenderweise auch die einzelnen Bausteine der Hybridinterferone, z. B. ein omega-Interferon.

Die Ausgangsbasis zur Konstruktion der entsprechenden Hybridinterferon-Plasmide ist somit die gemeinsame BglII-Restriktionsstelle in den Positionen 191-196 eines alpha1-, alpha2- und omega1-Interferongens, wie dies bereits vorstehend erwähnt wurde, wobei die Lücke für das Codon Nr. 45 im IFN-alpha2(Arg)-Gen mitgezählt wurde, sowie zur Isolierung des entsprechenden, erforderlichen Gens die für ein alpha1-, alpha2-Interferon bzw. für ein omega1-Interferon kodierenden Plasmide.

Hierzu wird nun zuerst erfindungsgemäß ein die omega1-Interferon-Expression verbesserndes neues Plasmid hergestellt.

Hierbei dient als Ausgangsplasmid das literaturbekannte und käuflich erhältliche Plasmid pAT 153 (Fa. Amersham, siehe auch A. J. Twigg et al. in Nature 283, 216-218 [1980]), beispielsweise das für IFN-alpha2(Arg) kodierende Plasmid parpER33 (siehe EP-A-0.115.613) und ein für ein omega1-Interferon der Formel

				5					10					15
Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Asn	His	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Asn	Thr	Leu
				20					25					30
Val	Leu	Leu	His	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Pro	Phe	Leu	Cys	Leu
				35					40					45
Lys	Asp	Arg	Arg	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro	Gln	Glu	Met	Val	Lys	Gly
				50					55					60
Ser	Gln	Leu	Gln	Lys	Ala	His	Val	Met	Ser	Val	Leu	His	Glu	Met
				65					70					75
Leu	Gln	Gln	Ile	Phe	Ser	Leu	Phe	His	Thr	Glu	Arg	Ser	Ser	Ala
				80					85					90
Ala	Trp	Asn	Met	Thr	Leu	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Thr	Gly	Leu	His
				95					100					105
Gln	Gln	Leu	Gln	His	Leu	Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Gln	Val	Val	Gly
				110					115					120
Glu	Gly	Glu	Ser	Ala	-X-	Ala	Ile	Ser	Ser	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu
				125					130					135
Arg	Arg	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ile	Arg	Val	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys
				140					145					150
Tyr	Ser	Asp	Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val	Arg	Met	Glu	Ile	Met	Lys

155 160 165
 Ser Leu Phe Leu Ser Thr Asn Met Gln Glu Arg Leu Arg Ser Lys
 170
 Asp Arg Asp Leu Gly Ser Ser

in der

X in Position 111 für Glu oder Gly steht,

kodierendes Plasmid wie das Plasmid pRHW11 oder 12 (siehe EP-A-0.170.204):

Das Plasmid parpER33, welches den par-Lokus mit der Sequenz der Formel

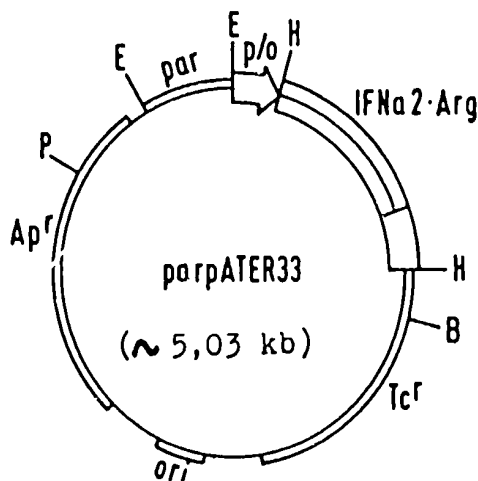
GAATTCCGAC AGTAAGACGG GTAAGCCTGT TGATGATACC GCTGCCTTAC 50
 TGGGTGCATT AGCCAGTCTG AATGACCTGT CACGGGATAA TCCGAAGTGG 100
 TCAGACTGGA AAATCAGAGG GCAGGAACCTG CTGAACAGCA AAAAGTCAGA 150
 TAGCACCACA TAGCAGACCC GCCATAAAAC GCCCTGAGAA ZCCGTGACGG 200
 GCTTTTCTTG TATTATGGGT AGTTTCCTTG CATGAATCCA TAAAAGGCGC 250
 CTGTAGTGCC ATTTACCCCC ATTCCTGACC AGAGCCGTGA GCGCAGCGAA 300
 CTGAATGTCA CGAAAAAGAC AWCAGACTCAG GTGCCTGATG GTCGGAGACA 350
 AAAGGAATAT TCAGCGATTT GCCCGAGGAA TTC 383

in der

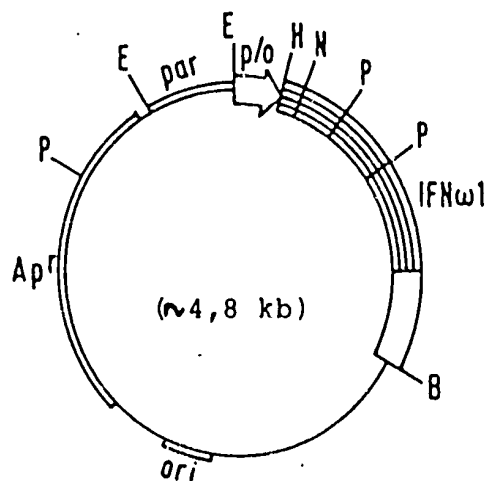
Z das Nukleotid G oder C und

W das Nukleotid G oder kein Nukleotid bedeuten, sowie die für die Expression erforderlichen Replikon- und Kontrollsequenzen des Plasmids pER103 (siehe Anspruch 17) enthält, wird mit BamHI und PstI geschnitten. Die dabei entstehenden beiden Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese, z. B. mit 1%igem Agarosegel, aufgetrennt und das kleinere Fragment, welches das IFN- α 2(Arg)-Gen enthält, wurde mittels Elektroelution isoliert. Die so erhaltene DNA wurde anschließend durch Zusatz von Äthanol ausgefällt, abzentrifugiert und in einem geeigneten Puffer wie TE-Puffer, z. B. in 10 mMol Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), pH = 8,0, und 1 mMol Äthylendinitrilotetraessigsäure-dinatriumsalz (EDTA) aufgenommen.

Das Plasmid pAT153 wird ebenfalls mit BamHI und PstI geschnitten. Die dabei entstehenden beiden Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese, z. B. mit 1%igem Agarosegel, aufgetrennt und das größere Fragment, welches den Replikationsursprung enthält, isoliert. Das so erhaltene größere Fragment wird anschließend mit dem aus dem Plasmid parpER33 erhaltenen kleinerem Fragment in Gegenwart einer Ligase, z. B. T₄ DNA-Ligase, ligiert. Zur Replikation der entstehenden Plasmide werden Bakterien, vorzugsweise E. coli vom Stamm HB 101 (Genotyp F⁻, hsdS20(r⁻, m⁻), recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 [Sm^r], xyl-5, mtl-1, supE44, lambda⁻), mit einer CaCl₂-Lösung gewaschen, und die so erhaltenen, kompetenten E. coli HB 101 mit der Ligasereaktionsmischung vermischt, und nach Inkubation bei 0°C wird die Plasmid-DNA durch Hitzeschock bei 42°C für 2 Minuten von den Bakterien aufgenommen. Anschließend werden die transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen LB-Agar (LB-Medium + 15 g/l Agar) plattiert. Auf diesem Agar können nur E. coli HB 101-Bakterien wachsen, die ein rekombiniertes Vektormolekül aufgenommen haben. Nach Inkubation bei 37°C wurden 12 der entstandenen Kolonien ausgewählt und von diesen nach der Methode von Birnboim et al. (siehe Nucl. Acids Res. 7, 1513 (1979)) die Plasmide isoliert. Durch Restriktionsenzymdoppelverdauung der ausgewählten Plasmide mit PstI-BamHI, PstI-PvuII oder EcoRI-BamHI und anschließender Gelelektrophorese der erhaltenen Fragmente wurde die Richtigkeit der Konstruktion dieser Plasmide bestätigt. Ein so erhaltenes Plasmid wurde ausgewählt und mit parpATER33 (Konstruktionschema: siehe Figur 1) bezeichnet. Dieses Plasmid zeigt transformiert in E. coli HB 101 des Phänotyp Ap^r (Ampicillin-Resistenz), Tc^r (Tetracyclin-Resistenz). Das so erhaltene Plasmid parpATER33 mit der Restriktionskarte



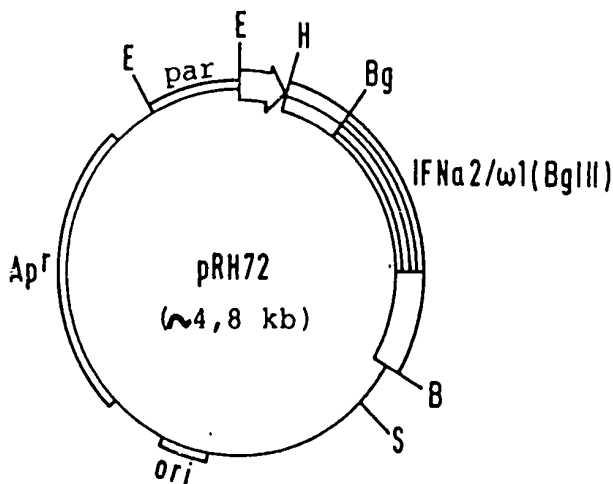
wird zur Herstellung eines die Expression von omega1-Interferon verbessernden Plasmids (Konstruktionsschema: siehe Figur 2) mit HindIII und BamHI geschnitten. Die dabei entstandenen drei Fragmente werden mittels Gelelektrophorese, z. B. mit 1%igem Agarosegel, aufgetrennt und das größte, etwa 3750 Basenpaare (bp) lange Fragment (Fragment a), welches den Tryptophan-Promotor/Operator (*Serratia marcescens*), den Replikationsursprung und das Ap^r-Gen trägt, isoliert und mit der für ein omega1-Interferon kodierenden DNA ligiert. Diese DNA erhält man durch Schneiden eines für omega1-Interferon kodierenden Plasmid, vorzugsweise durch Schneiden des Plasmids pRHW 11 bzw. pRHW 12 mit BamHI und HindIII und anschließendem Auftrennen der beiden so erhaltenen Fragmente mittels Gelelektrophorese, wobei das gewünschte Gen in dem kleineren, etwa 800bp langen Fragment enthalten ist. Zur Replikation der entstandenen Plasmide werden Bakterien, vorzugsweise *E. coli* HB 101, mit einer CaCl₂-Lösung gewaschen und die so erhaltenen, kompetenten *E. coli* HB 101 mit der Ligasereaktionsmischung vermischt, und nach Inkubation bei 0°C wird die Plasmid-DNA durch Hitzeschock bei 42°C für 2 Minuten von den Bakterien aufgenommen. Anschließend werden die transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen LB-Agar plattiert. Auf diesem Agar können nur *E. coli* HB 101-Bakterien wachsen, die ein rekombinantes Vektormolekül aufgenommen haben. Nach Inkubation bei 37°C werden 6 der entstandenen Kolonien ausgewählt, und von diesen nach der Methode von Birnboim et al. (siehe Nucl. Acids Res. 7, 1513 [1979]) die Plasmide isoliert. Durch Restriktionsenzymverdauung der ausgewählten Plasmide mit EcoRI, HindIII, NcoI und PstI und anschließender Gelelektrophorese wurde die Richtigkeit der Konstruktion dieser Plasmide bestätigt. Ein so erhaltenes Plasmid mit der Restriktionskarte



, wobei IFN ω 1 die für IFN-omega1(Gly) oder IFN-omega1(Glu) kodierende DNA-Sequenz darstellt, wurde ausgewählt, und mit pRHW 14 (siehe Figur 2) bezeichnet, wenn als Ausgangsplasmid das Plasmid pRHW 12, welches für omega1(Gly)-Interferon kodiert, verwendet wird. Dieses Plasmid zeigt transformiert in *E. coli* HB 101 den Phänotyp Ap^r und Tc^r. Bei Verwendung von pRHW 11 als Ausgangsplasmid erhält man analog das Plasmid pRHW 13, welches für omega1(Glu)-Interferon kodiert.

Das so erhaltene Plasmid pRHW 14 weist eine doppelt so große Expressionsrate für das omega1(Gly)-Interferon auf als das bisher bekannte Plasmid pRHW 12 (siehe EP-A-0.170.204) wie im Maxizell-System [siehe J. Bacteriol. 137, 692-693 (1979)] nachgewiesen werden kann. Hierzu wird *E. coli* CSR 603 [Genotyp F⁻, thr-1, leuB6, proA2, proA21, phr-1, recA1, argE3, thi-1, uvrA6, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, gyrA98 (nalA98), rpsL31, tsx-33, lambda⁻, supE44], welcher defizient im Reparatursystem für UV-induzierte Schäden ist, mit dem Plasmiden pRHW 12 und pRHW 14 transformiert. Wird die Strahlendosis so gewählt, daß zwar das Bakterienchromosom oft, die Plasmide aber kaum geschädigt werden, so erfolgt Transkription und in der Folge Translation vorwiegend nur von Plasmid-kodierten Genen. Enthält das Medium ³⁵S-Methionin, so werden hauptsächlich Plasmid-Genprodukte markiert, die nach Auftrennen auf einem Acrylamidgel unter Verwendung einer Verstärkerfolie direkt mit Hilfe eines Röntgenfilms registriert werden können (siehe Figur 3). Das Ampicillin-Resistenzgenprodukt (β -Lactamase, bla) wird in beiden Fällen gleich stark markiert. Im Falle des pRHW 14 ist jedoch das omega1(Gly)-Interferon doppelt so stark markiert wie beim pRHW 12.

Zur Herstellung eines für ein Hybridinterferon der Formel 1 kodierenden Plasmids, das vor der gemeinsamen BglII-Schnittstelle die für α 1- oder α 2-Interferon kodierende DNA-Sequenzen enthält (Konstruktionsschema: siehe Figur 4), wird beispielsweise das Plasmid parpATER 33 und ein für ein omega1-Interferon kodierendes Plasmid wie das Plasmid pRHW 14 jeweils mit BglII und SphI geschnitten. Die hierbei entstandenen Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese, z. B. mit 1%igem Agarosegel, aufgetrennt, eluiert und mittels Äthanol-Präzipitation gereinigt. Nach Lösen der Fragmente in einem geeigneten Puffer, z. B. TE-Puffer, wurde das aus dem Plasmid parpATER 33 erhaltene, große Fragment mit dem aus dem Plasmid pRHW 14 erhaltenen, kleineren Fragment in Gegenwart einer Ligase, z. B. T₄ DNA-Ligase, ligiert. Zur Replikation der entstandenen Plasmide wurden Bakterien, vorzugsweise *E. coli* vom Stamm HB 101 [Genotyp F⁻, hsdS20(r⁻, m⁻, recA13, ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20 (Sm^r), xyl-5, mtl-1, supE44, lambda⁻], mit einer CaCl₂-Lösung gewaschen, und die so erhaltenen kompetenten *E. coli* HB 101 mit der Ligasereaktionsmischung vermischt, und nach Inkubation bei 0°C wird die Plasmid-DNA durch Hitzeschock bei 42°C für 2 Minuten von den Bakterien aufgenommen. Anschließend werden die transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen LB-Agar (LB-Medium + 15g/l Agar) plattiert. Auf diesem Agar können nur *E. coli* HB 101-Bakterien wachsen, die ein rekombinantes Vektormolekül aufgenommen haben. Nach Inkubation bei 37°C wurden mehrere der entstandenen Kolonien ausgewählt und von diesen nach der Methode von Birnboim et al. [siehe Nucl. Acids Res. 7, 1513 (1979)] die Plasmide isoliert. Durch Restriktionsenzymdoppelverdauung der ausgewählten Plasmide mit BglII und SphI und anschließender Gelelektrophorese der erhaltenen Fragmente wurde die Richtigkeit der Konstruktion dieser Plasmide bestätigt. Ein so erhaltenes Plasmid wurde ausgewählt und mit pRHW 72 bezeichnet. Dieses Plasmid mit der Restriktionskarte



zeigt transformiert in E.coli HB 101 den Phänotyp Ap^r und Tc^r und kodiert für das IFN-α2/ω1(Gly)(BglII) der Formel

				5					10					15
Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Thr	His	Ser	Leu	Gly	Ser	Arg	Arg	Thr	Leu
				20					25					30
Met	Leu	Leu	Ala	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Leu	Phe	Ser	Cys	Leu
				35					40					45
Lys	Asp	Arg	Arg	Asp	Phe	Gly	Phe	Pro	Gln	Glu	Glu	Phe	Gly	Asn
				50					55					60
Gln	Phe	Gln	Lys	Ala	Glu	Thr	Ile	Pro	Val	Leu	His	Glu	Met	Ile
				65					70					75
Gln	Gln	Ile	Phe	Ser	Leu	Phe	His	Thr	Glu	Arg	Ser	Ser	Ala	Ala
				80					85					90
Trp	Asn	Met	Thr	Leu	Leu	Asp	Gln	Leu	His	Thr	Gly	Leu	His	Gln
				95					100					105
Gln	Leu	Gln	His	Leu	Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Gln	Val	Val	Gly	Glu
				110					115					120
Gly	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Ile	Ser	Ser	Pro	Ala	Leu	Thr	Leu	Arg
				125					130					135
Arg	Tyr	Phe	Gln	Gly	Ile	Arg	Val	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys	Lys	Tyr
				140					145					150
Ser	Asp	Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val	Arg	Met	Glu	Ile	Met	Lys	Ser
				155					160					165
Leu	Phe	Leu	Ser	Thr	Asn	Met	Gln	Glu	Arg	Leu	Arg	Ser	Lys	Asp
				170										
Arg	Asp	Leu	Gly	Ser	Ser									

, dessen Met- und N-Formyl-Met-Derivat sowie dessen N-glykosyliertes Derivat, und enthält die für dieses Peptid kodierende Sequenz der Formel

ATG	TGT	GAT	CTG	CCT	CAA	ACC	CAC	AGC	CTG	GGT	AGC	AGG	AGG	ACC	45
TTG	ATG	CTC	CTG	GCA	CAG	ATG	AGG	AGA	ATC	TCT	CTT	TTC	TCC	TGC	90
TTG	AAG	GAC	AGA	CGT	GAC	TTT	GGA	TTT	CCC	CAG	GAG	GAG	TTT	GGC	135
AAC	CAG	TTC	CAA	AAG	GCT	GAA	ACC	ATC	CCT	GTC	CTC	CAT	GAG	ATG	180

```

ATC CAG CAG ATC TTC AGC CTC TTC (AC ACA GAG CGC TCC TCT GCT 225
GCC TGG AAC ATG ACC CTC CTA GAC CAA CTC CAC ACT GGA CTT CAT 270
CAG CAA CTG CAA CAC CTG GAG ACC TGC TTG CTG CAG GTA GTG GGA 315
GAA GGA GAA TCT GCT GGG GCA ATT AGC AGC CCT GCA CTG ACC TTG 360
AGG AGG TAC TTC CAG GGA ATC CGT GTC TAC CTG AAA GAG AAG AAA 405
TAC AGC GAC TGT GCC TGG GAA GTT GTC AGA ATG GAA ATC ATC AAA 450
TCC TTG TTC TTA TCA ACA AAC ATG CAA GAA AGA CTG AGA AGT AAA 495
GAT AGA GAC CTG GGC TCA TCT TGA 519

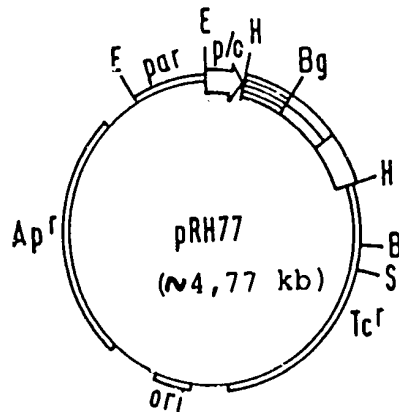
```

oder deren degenerierte Varianten.

Zur Herstellung eines für ein Hybridinterferon der Formel 1 kodierendes Plasmids, das vor der gemeinsamen BglII-Schnittstelle die für ein omega1-Interferon kodierende DNA-Sequenz enthält (Konstruktionsschema: siehe Figur 5), muß, falls in der DNA-Sequenz des alpha-Interferons zwei BglII-Schnittstellen wie in der DNA-Sequenz des IFN-alpha2(Arg) vorhanden sind, in zwei Schritten verfahren werden:

Im ersten Schritt wird das aus dem Plasmid pRHWL4 durch Schnitt mit BglII und SphI gewonnene große Fragment mit dem aus dem Plasmid parpATER33 durch Verdauen mit BglII und SphI gewonnene Fragment, welches den C-Terminus des IFN-alpha2(Arg) kodiert, in Gegenwart einer Ligase, z.B. T₄ DNA-Ligase, ligiert. Zur Replikation der entstandenen Plasmide wurden Bakterien, vorzugsweise E.coli HB 101, wie vorstehend bei der Herstellung des Plasmids pRH72 beschrieben, transformiert, kultiviert und auf ihre Konstruktion hin überprüft.

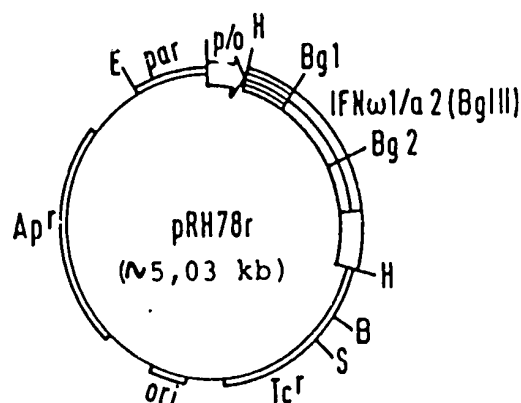
Ein so erhaltenes Plasmid wurde ausgewählt und mit pRH77 bezeichnet, dieses weist folgende Restriktionskarte auf:



Im 2. Schritt muß nunmehr, um das Gen für das Hybridinterferon, z.B. des IFN-omega1/alpha2(BglII), zu komplettieren, das beim Schneiden von parpATER33 entfernte Fragment mit den Positionen 192-455 wieder in das Plasmid pRH77 eingebracht werden. Hierzu wird das Plasmid pRH77 mit BglII geschnitten, und das 5'-terminale Phosphat mit Kalbsdarm-Phosphatase (CIP) entfernt. Die so erhaltene linearisierte Form des Plasmids pRH77 wurde durch Gelelektrophorese, z.B. mit einer 1%igen Agarosegel, aufgetrennt, isoliert und mittels Äthanol-Präzipitation gereinigt. Nach Lösen des so erhaltenen linearisierten Fragments in einem geeigneten Puffer, z.B. in TE-Puffer, wurde dieses mit dem beim ursprünglichen Verdauen von parpATER33 und BglII und SphI erhaltenen 263bp langen Fragment in Gegenwart einer Ligase, z.B. T₄ DNA-Ligase, ligiert. Zur Replikation der entstandenen Plasmide werden Bakterien, vorzugsweise E.coli HB 101, wie vorstehend bei der Herstellung des Plasmids pRH72 beschrieben, transformiert, kultiviert und auf ihre Konstruktion hin durch Schnitt mit den Restriktionsendonucleasen AluI oder HaeIII auf ihre Richtigkeit hin untersucht. Die Insertion des 263pb langen Fragments erfolgt hierbei auf Grund der identischen Enden in zwei Orientierungen.

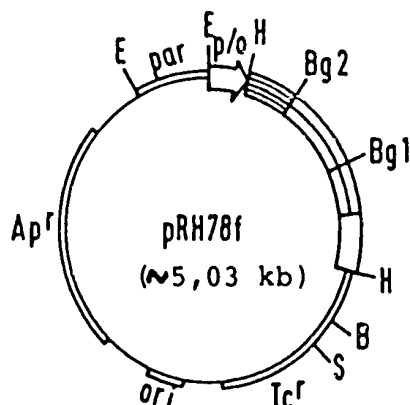
Das Plasmid, in dem das 263bp lange BglII-Fragment in der für die Expression richtigen Lage insertiert wurde, wurde mit pRH78r, und jenes mit der für die Expression falschen Orientierung mit pRH78f bezeichnet.

Beide Plasmide zeigen transformiert in E.coli HB 101 den Phänotyp Ap^r und Tc^r. Das Plasmid pRH78r mit der Restriktionskarte



kodiert folgende Polypeptidsequenz für das IFN-omega1/alpha2(BglII) und enthält die für dieses Peptid kodierende Sequenz:

															5																10																15												
Met	Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Asn	His	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Asn	Thr																																													
ATG	TGT	GAT	CTG	CCT	CAG	AAC	CAT	GGC	CTA	CTT	AGC	AGG	AAC	ACC	45																																												
															20																25																30												
Leu	Val	Leu	Leu	His	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Pro	Phe	Leu	Cys																																													
TTG	GTG	CTT	CTG	CAC	CAA	ATG	AGG	AGA	ATC	TCC	CCT	TTC	TTG	TGT	90																																												
															35																40																45												
Leu	Lys	Asp	Arg	Arg	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro	Gln	Glu	Met	Val	Lys																																													
CTC	AAG	GAC	AGA	AGA	GAC	TTC	AGG	TTC	CCC	CAG	GAG	ATG	GTA	AAA	135																																												
															50																55																60												
Gly	Ser	Gln	Leu	Gln	Lys	Ala	His	Val	Met	Ser	Val	Leu	His	Glu																																													
GGG	AGC	CAG	TTG	CAG	AAG	GCC	CAT	GTC	ATG	TCT	GTC	CTC	CAT	GAG	180																																												
															65																70																75												
Met	Leu	Gln	Gln	Ile	Phe	Asn	Leu	Phe	Ser	Thr	Lys	Asp	Ser	Ser																																													
ATG	CTG	CAG	<u>CAG</u>	<u>ATC</u>	<u>TTC</u>	AAT	CTC	TTC	AGC	ACA	AAG	GAC	TCA	TCT	225																																												
															80																85																90												
Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Thr	Leu	Leu	Asp	Lys	Phe	Tyr	Thr	Glu	Leu																																													
GCT	GCT	TGG	GAT	GAG	ACC	CTC	CTA	GAC	AAA	TTC	TAC	ACT	GAA	CTC	270																																												
															95																100																105												
Tyr	Gln	Gln	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Ile	Gln	Gly	Val																																													
TAC	CAG	CAG	CTG	AAT	GAC	CTG	GAA	GCC	TGT	GTG	ATA	CAG	GGG	GTG	315																																												
															110																115																120												
Gly	Val	Thr	Glu	Thr	Pro	Leu	Met	Lys	Glu	Asp	Ser	Ile	Leu	Ala																																													
GGG	GTG	ACA	GAG	ACT	CCC	CTG	ATG	AAG	GAG	GAC	TCC	ATT	CTG	GCT	360																																												
															125																130																135												
Val	Arg	Lys	Tyr	Phe	Gln	Arg	Ile	Thr	Leu	Tyr	Leu	Lys	Glu	Lys																																													
GTG	AGG	AAA	TAC	TTC	CAA	AGA	ATC	ACT	CTC	TAT	CTG	AAA	GAG	AAG	405																																												
															140																145																150												
Lys	Tyr	Ser	Pro	Cys	Ala	Trp	Glu	Val	Val	Arg	Ala	Glu	Ile	Met																																													
AAA	TAC	AGC	CCT	TGT	GCC	TGG	GAG	GTT	GTC	AGA	GCA	GAA	ATC	ATG	450																																												
															155																160																165												
Arg	Ser	Phe	Ser	Leu	Ser	Thr	Asn	Leu	Gln	Glu	Ser	Leu	Arg	Ser																																													
<u>AGA</u>	<u>TCT</u>	TTT	TCT	TTG	TCA	ACA	AAC	TTG	CAA	GAA	AGT	TTA	AGA	AGT	495																																												
Lys Glu																																																											
AAG GAA TGA																																																											



				5					10					15					
Met	Cys	Asp	Leu	Pro	Gln	Asn	His	Gly	Leu	Leu	Ser	Arg	Asn	Thr					
ATG	TGT	GAT	CTG	CCT	CAG	AAC	CAT	GGC	CTA	CTT	AGC	AGG	AAC	ACC	45				
				20					25					30					
Leu	Val	Leu	Leu	His	Gln	Met	Arg	Arg	Ile	Ser	Pro	Phe	Leu	Cys					
TTG	GTG	CTT	CTG	CAC	CAA	ATG	AGG	AGA	ATC	TCC	CCT	TTC	TTG	TGT	90				
				35					40					45					
Leu	Lys	Asp	Arg	Arg	Asp	Phe	Arg	Phe	Pro	Gln	Glu	Met	Val	Lys					
CTC	AAG	GAC	AGA	AGA	GAC	TTC	AGG	TTC	CCC	CAG	GAG	ATG	GTA	AAA	135				
				50					55					60					
Gly	Ser	Gln	Leu	Gln	Lys	Ala	His	Val	Met	Ser	Val	Leu	His	Glu					
GGG	AGC	CAG	TTG	CAG	AAG	GCC	CAT	GTC	ATG	TCT	GTC	CTC	CAT	GAG	180				
				65															
Met	Leu	Gln	Gln	Ile	Ser														
ATG	CTG	CAG	CAG	ATC	TCA	TGA	TTT	CTG	CTC	TGA	CAA	CCT	CCC	AGG	225				
CAC	AAG	GGC	TGT	ATT	TCT	TCT	CTT	TCA	GAT	AGA	GAG	TGA	TTC	TTT	270				
GGA	AGT	ATT	TCC	TCA	CAG	CCA	GAA	TGG	AGT	CCT	CCT	TCA	TCA	GGG	315				
GAG	TCT	CTG	TCA	CCC	CCA	CCC	CCT	GTA	TCA	CAC	AGG	CTT	CCA	GGT	360				
CAT	TCA	GCT	GCT	GGT	AGA	GTT	CAG	TGT	AGA	ATT	TGT	CTA	GGA	GGG	405				
TCT	CAT	CCC	AAG	CAG	CAG	ATG	AGT	CCT	TTG	TGC	TGA	AGA	GAT	TGA	450				
AGA	TCT	TTT	TCT	TTG	TCA	ACA	AAC	TTG	CAA	GAA	AGT	TTA	AGA	AGT	505				
AAG	GAA	TGA													514				

Zur Replikation bzw. zur Expression können die neuen Plasmide der vorliegenden Erfindung in einen bakteriellen Wirt eingebracht werden. Hierbei haben sich Prokaryoten wie *E. coli* K 12, Stamm 294, (ATCC Nr. 31 448), *E. coli* X 1778 (ATCC Nr. 31 537), *E. coli* W 3110 (F⁻, Lambda⁻, Prototroph, ATCC Nr. 27 325), *E. coli* HB 101 (F⁻, hsdS20 [r⁻, m⁻], recA 13, ara-14, proA 2, lacY 1, galK 2, rpsL 20 (Smr), xyl-5, mtl-1, supE 44, lambda⁻), Bazillen wie *Bacillus subtilis*, und andere Enterobacteriaceae, wie *Salmonella typhimurium* oder *Serratia marcescens* und verschiedene Pseudomonaden als geeignet erwiesen.

Zur Expression der neuen Hybridinterferon wurde beispielsweise das Plasmid pRH 72, pRH 78f und pRH 78r jeweils in *E. coli* transformiert und kultiviert. Die antivirale Aktivität der exprimierten Polypeptide wurde im Zellüberstand nach der Zerstörung der Zellwände und Abzentrifugation der Bakterentrümmer und mittels des CPE-Reduktionstest bestimmt. Hierbei zeigte sich, daß die aus *E. coli* transformiert mit pRH 72 und *E. coli* transformiert mit pRH 78f gewonnenen Zellüberstände keine antiviralen Eigenschaften aufweisen. Überraschenderweise weist jedoch der aus Plasmid pRH 78r gewonnene Zellüberstand, der das IFN-omega1/a2(BglII) enthält, eine etwa viermal höhere spezifische antivirale Aktivität auf A549-Zellen als IFN-a2(Arg) auf. Die für ein neuen Hybridinterferon kodierenden DNA-Sequenzen der neuen erfindungsgemäß hergestellten Plasmide können des weiteren nach entsprechender Veränderung in jeden anderen Organismus eingebracht werden.

Hierbei kann die Expression und Translation einer derartigen Sequenz auch unter Kontrolle anderer Regulationssysteme, die als

„homolog“ zu dem Organismus in seiner untransformierten Form gelten können, ablaufen. So enthält z. B. chromosomale DNA von einem Lactose-abhängigen *E. coli* ein Lactose oder Lac-Operon, das durch Ausschüttung des Enzyms Beta-Galactosidase den Lactose-Abbau ermöglicht.

Die Lac-Kontrollelemente können aus dem Bacteriophagen Lambda-plac5, der infektiös für *E. coli* ist, erhalten werden. Das Lac-Operon des Phagen kann durch Transduktion aus derselben Bakterien-Spezies stammen. Regulationssysteme, die bei dem erfindungsgemäßen Verfahren Verwendung finden können, können auch aus plasmidischer DNA stammen, die dem Organismus eigen ist. Das Lac-Promotor-Operator-System kann durch IPTG (Isopropylthiogalactosid) induziert werden. Andere Promotor-Operator-Systeme oder Teile hiervon können genauso verwendet werden: beispielsweise Arabinose-Promotor/Operator, Colicin E₁-Promotor/Operator, Galactose-Promotor/Operator, alkalischer Phosphatase-Promotor/Operator, trp-Promotor/Operator, Xylose-A-Promotor/Operator, tacPromotor u. ä.

Zusätzlich zu Prokaryoten können auch Eukaryoten, wie Hefe verwendet werden. *Saccharomyces cerevisiae* ist die am meisten verwendete unter den eukaryotischen Mikroorganismen, obwohl eine Anzahl anderer Spezies allgemein erhältlich ist. Zur Expression in *Saccharomyces* wird beispielsweise das Plasmid YRp7 (Stinchcomb et al. Natur 282, 39 [1979]; Kingsman et al., Gene 7, 141 [1979]; Tschumper et al., Gene 10, 157 [1980]) und das Plasmid YEp13 (Bwach et al., Gene 8, 121–133 [1979]) üblicherweise verwendet. Das Plasmid YRp7 enthält das TRP1-Gen, das einen Selektionsmarker für eine Hefemutante bereitstellt, die unfähig ist, in tryptophanlosem Medium zu wachsen; beispielsweise ATCC Nr. 44076.

Das Vorhandensein des TRP1-Schadens als Charakteristikum des Hefe-Wirtsgenoms stellt dann ein wirksames Hilfsmittel dar, um die Transformation nachzuweisen, indem ohne Tryptophan kultiviert wird. Ganz ähnlich verhält es sich bei dem Plasmid YEp13, das das Hefe-Gen LEU2, das zur Ergänzung einer LEU2-minus-Mutante verwendet werden kann, enthält. Geeignete Promotor-Sequenzen für Hefe Vektoren beinhalten die 5'-flankierende Region der Gene des ADHI (Ammerer G., Methods of Enzymology 101, 192–201 [1983]), 3-Phosphoglycerate-Kinase (Hitzeman et al., J. Biol. Chem. 255, 2073 [1980]) oder andere glykolytische Enzyme (Kawaski und Fraenkel, BBRC 108, 1107–1112 [1982]) wie Enolase, Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, Hexokinase, Pyruvat-Decarboxylase, Phosphofructokinase, Glucose-6-Phosphat-Isomerase, Phosphoglucose-Isomerase und -Glucokinase. Bei der Konstruktion geeigneter Expressionsplasmide können die mit diesen Genen assoziierten Terminationssequenzen ebenfalls in den Expressions-Vektor am 3'-Ende der zu exprimierenden Sequenz eingesetzt werden, um Polyadenylierung und Termination der mRNA vorzusehen.

Andere Promotoren, die zudem noch den Vorteil der durch Wachstumsbedingungen kontrollierten Transkription besitzen, sind die Promotor-Regionen der Gene für Alkohol-Dehydrogenase-2, Isocytochrom C, Saure-Phosphatase, abbauende Enzyme, die mit dem Stickstoff-Metabolismus gekoppelt sind, die oben erwähnte Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase und Enzyme, die für die Verarbeitung von Maltose und Galaktose verantwortlich sind. Promotoren, die durch den Hefe Mating Typ Locus reguliert werden, beispielsweise Promotoren der Gene BARI, MFal, STE2, STE3, STE5 können bei temperaturregulierten Systemen durch die Verwendung von temperaturabhängigen sir Mutationen eingesetzt werden. (Rhine PH. D. in Thesis, University of Oregon, Eugene, Oregon [1979], Herskowitz and Oshima, The Molecular Biology of the Yeast *Saccharomyces*, part I, 181–209 [1981], Cold Spring Harbor Laboratory). Diese Mutationen beeinflussen die Expression der ruhenden Mating Typ Kassetten von Hefen und dadurch indirekt die Mating-Typ-abhängigen Promotoren. Generell ist jedoch jeder Vektor geeignet, der einen Hefe-kompatiblen Promotor, sowie Hefe spezifische Replikations- und Terminationssequenzen enthält.

Zusätzlich zu Mikroorganismen sind Kulturen multizellulärer Organismen ebenfalls geeignete Wirtsorganismen. Im Prinzip ist jede dieser Kulturen einsetzbar, ob von Wirbeltier- oder wirbellosen Zellkulturen. Größtes Interesse besteht jedoch an Wirbeltier-Zellen, so daß die Vermehrung von Wirbeltierzellen in Kultur (Gewebe-Kultur) in den letzten Jahren zu einer routinemäßigen Methode wurde (Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, Editors [1973]). Beispiele solcher nützlichen Wirtszelllinien sind VERO- und HeLa-Zellen, Goldhamster-Eierstock (CHO)-Zellen und W138, 9HK, COS-7 und MDCK-Zelllinien. Expressionsvektoren für diese Zellen enthalten üblicherweise einen Replikationsursprung, einen Promotor, der vor dem zu exprimierenden Gen lokalisiert ist, gemeinsam mit der notwendigen RNA-Splicing-Stelle, Polyadenylierungsstelle und transkriptionelle Terminations-Sequenzen.

Bei der Verwendung in Säugtierzellen werden die Kontrollfunktionen auf den Expressions-Vektoren oftmals aus viralem Material verwendet. Beispielsweise stammen die üblicherweise verwendeten Promotoren aus Polyoma Adenovirus 2, und besonders häufig aus Simian Virus 40 (SV 40). Die Promotoren der frühen und späten Gene des SV 40 sind besonders nützlich, da beide leicht aus dem Virus als Fragment zu erhalten sind, das auch noch den viralen Replikationsursprung des SV 40 enthält. (Fiers et al., Nature 273, 113 [1978]). Auch können kleinere oder größere Fragmente des SV 40 verwendet werden, vorausgesetzt, sie enthalten die annähernd 250bp lange Sequenz, die von der Hind III Schnittstelle bis zur Bgl I Schnittstelle in der viralen Replikationsstelle reicht. Außerdem ist es ebenfalls möglich und oft empfehlenswert, Promotor- oder Kontroll-Sequenzen zu verwenden, die normalerweise mit den gewünschten Gensequenzen verknüpft sind, vorausgesetzt, diese Kontroll-Sequenzen sind kompatibel zu den Wirtszellsystemen.

Eine Replikationsstelle kann entweder durch entsprechende Vektorkonstruktion vorgesehen werden, um eine exogene Stelle einzubauen, beispielsweise aus SV 40 oder anderen viralen Quellen (z. B. Polyoma, Adeno, VSV, PBV, usw.) oder kann durch die chromosomalen Replikationsmechanismen der Wirtszelle vorgesehen werden. Wird der Vektor in das Wirtszellenchromosom integriert, reicht die zuletztgenannte Maßnahme meistens aus.

Basierend auf ihrem biologischen Wirkungsspektrum sind die neuen, erfindungsgemäßen Hybride, insbesondere das IFN-omega1/alpha2(BglII) Interferon verwendbar für jede Art der Behandlung, für die auch die bekannten Interferone eingesetzt werden. Diese beinhalten beispielsweise Herpesvirus, Rhinovirus, virale Infektionen bei AIDS sowie andere virale Erkrankungen, verschiedene Krebsarten und ähnliches. Die neuen Interferone können alleine oder in Kombination mit anderen bekannten Interferonen oder biologisch aktiven Produkten eingesetzt werden, beispielsweise mit IFN-gamma, IL-2, anderen Immun-Modulatoren und ähnlichen.

Ein IFN-omega/alpha-Hybrid wie IFN-omega1/alpha2(BglII) kann parenteral verabreicht werden in Fällen, in denen Antitumor oder antivirale Behandlung erforderlich ist, und zur antiviralen Prophylaxe in Immunsupprimierten Patienten. Dosierung und Dosierungsrate können ähnlich denen sein, die zur Zeit bei klinischen Untersuchungen für IFN-alpha-Materialien gelten z. B. etwa $(1-10) \times 10^6$ Einheiten täglich und bei Präparaten, die zu mehr als 1% rein sein, bis zu beispielsweise 5×10^7 Einheiten täglich. Beispielsweise können für eine zweckmäßige Dosierungsform bei einem im wesentlichen homogenen, bakteriell produzierten IFN-omega1/alpha2(BglII), bei parenteraler Verwendung 3mg IFN-omega1/alpha2(BglII) in 25ml 5%igem menschlichem Serum Albumin gelöst werden. Diese Lösung wird dann durch ein bakteriologisches Filter gegeben, und die gefilterte Lösung aseptisch

auf 100 Fläschchen verteilt, von dem jedes 6×10^6 Einheiten reines IFN-omega1/ α 2(BglII) zur parenteralen Applikation geeignet, enthält. Die Gläschen werden vor Verwendung vorzugsweise kühl (-20°C) aufbewahrt. Die erfindungsgemäßen Substanzen können in bekannter Weise formuliert werden, um pharmazeutisch verwendbare Mittel zu erhalten, wobei das erfindungsgemäße Polypeptid mit einer pharmazeutischen, akzeptablen Trägersubstanz vermischt wird. Gebräuchliche Trägerstoffe und ihre Formulierung sind bei E. W. Martin in Remington's Pharmaceutical Sciences beschrieben, worauf ausdrücklich Bezug genommen wird. IFN-omega1/ α 2(BglII) wird mit einer angemessenen Menge des Trägerstoffes vermischt, um geeignete pharmazeutische Mittel zu schaffen, die für eine effektive Anwendung beim Empfänger (Patienten) geeignet sind. Bevorzugt wird eine parenterale Applikation vorgenommen.

Des weiteren eignen sich die neuen Hybridinterferone zur Herstellung von Antikörpern gegen diese Interferone, insbesondere das IFN-omega1/ α 2(BglII), die zugleich auch die parenteralen Interferone IFN- α 2 und IFN-omega1 erkennen. Die so hergestellten Antikörper sind daher für die Immunaффinitätschromatographie von omega-Interferonen geeignet.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind somit neue monoklonale Antikörper-produzierende Hybridzelllinien, Verfahren zu deren Herstellung und ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern der Maus mit Spezifität für IFN- α und omega-Interferon, insbesondere für omega1-Interferon.

Die neuen monoklonalen Antikörper sind daher insbesondere zur Hochreinigung und zum Nachweis von omega1(Glu)- oder omega1(Gly)-Interferon geeignet.

Die hierfür erforderlichen Antikörper-produzierenden Hybridzelllinien erhält man durch Zellfusion von Milzzellen von mit einem Hybridinterferon wie IFN-omega1/ α 2(BglII) immunisierten Mäusen mit Myelomzellen, z. B. Myelomzellen der Linie P3-X-63 Ag-8653 (siehe Nature 266, 550-552 (1977)). Eine so erhaltene Zelle sezerniert große Mengen eines Antikörpers, der die antivirale Aktivität sowohl des zur Immunisierung eingesetzten Hybridinterferons als auch der beiden parentalen Interferone, z. B. im Falle des IFN-omega1/ α 2(BglII) die des omega1-Interferon und des IFN- α 2(Arg), neutralisieren kann und für die Affinitätschromatographie von omega1-Interferon geeignet ist.

Der so hergestellte Antikörper kann nach kovalenter Bindung an einen biologisch inaktiven Träger zur Hochreinigung von omega1-Interferone oder IFN- α 2 verwendet werden.

Die kovalente Bindung des Antikörpers erfolgt hierbei an einen entsprechend aktivierten Träger, vorzugsweise auf Dextran-Basis, z. B. an CNBr-aktivierte Sepharose oder CH-aktivierte Sepharose der Firma Pharmacia, Uppsala. Zur Hochreinigung wird eine Lösung des zu reinigenden omega1-Interferons, welche zweckmäßigerweise entweder gemäß den in der EP-A-0 170 204 beschriebenen Verfahren oder erfindungsgemäß mit Hilfe der vorstehend beschriebenen neuen Plasmide erhalten wird, bei schwach basischen pH, z. B. bei einem pH 7-8, vorzugsweise jedoch bei einem pH 7,5, über einen so hergestellten Antikörper-Affinitäts-Träger gepumpt, solange bei pH 5 gewaschen bis das Eluat proteinfrei ist, und anschließend das gebundene Interferon im sauren Bereich, z. B. mit Hilfe von 0,1 molarer Zitronensäure in 25%igem Äthylenglykol, eluiert. Die so erhaltenen proteinhaltigen Fraktionen werden anschließend über einen stark sauren Kationenaustauscher, z. B. den Kationenaustauscher Mono-S der Firma Pharmacia, chromatographiert. Hierbei wird das Humaninterferon des obigen Eluats sofort von der Kationenaustauscher-Säule adsorbiert und anschließend mit Hilfe eines NaCl-Gradienten eluiert.

Die für die Durchführung der vorliegenden Anmeldung erforderlichen Basisplasmide sind in Sachen der EP-A-0 115 613 bzw. der EP-A-0 170 204 bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen hinterlegt worden, z. B.

pER 103 unter der DMS-Nr. 2773 am 20. Dezember 1983,
E 76 E 9 unter der DMS-Nr. 3003 und
P 9 A 2 unter der DMS-Nr. 3004 jeweils am 4. Juli 1984,

wobei für diese Klone bereits die erforderliche Freigabeerklärung abgegeben wurde. Unter Verwendung dieser Plasmide ist es dem Fachmann auf diesem Gebiet ohne weiteres möglich den Gegenstand der vorliegenden Erfindung an Hand der EP-A-0 115 613 und der EP-A-0 170 204 (siehe auch Nucleic Acids Res. 13, 4739-4749 (1985)) nachzuarbeiten.

Ausführungsbeispiel

Die Erfindung wird nachstehend an einigen Beispielen näher erläutert. Die nachfolgenden Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne diese jedoch einzuschränken:

Vorbemerkung

Alle Enzymreaktionen werden unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen durchgeführt.

Beispiel 1

Herstellung von parpATER33

10 μg parpER33 werden in 200 μl Reaktionslösung mit je 10 Einheiten BamHI und PstI geschnitten. Anschließend werden die zwei entstehenden Fragmente in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt (1% Agarose in $1 \times$ TBE-puffer: 10,8 g/l Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris), 5,5 g/l Borsäure, 0,93 g/l Äthylendinitrilo-tetraessigsäure-dinatriumsalz (EDTA) und 0,5 mg/l Äthidiumbromid (EtBr), Laufpuffer ist $1 \times$ TBE; Elektrophorese bei etwa 5 V/cm; Sichtbarmachen der DNA-Fragmente durch Bestrahlung des Agarosegels mit UV-Licht (254 nm). Das kleinere, das Interferon-alpha 2-Arg (IFN- α 2(Arg)) enthaltende Fragment wird isoliert (Elektrophorese der DNA-Bande auf DE-81 Papier (Whatman), Waschen des Papiers mit 200 mM NaCl, 25 mM Tris pH = 7,5, 1 mM EDTA und Elution der DNA mit 1 M NaCl, 25 mM Tris, pH = 7,5, 1 mM EDTA) und durch Zusatz von 2,5 Vol Äthanol wird die DNA ausgefällt. Nach dem Abzentrifugieren wird die DNA getrocknet und in einem geeigneten Volumen TE-Puffer (10 mM Tris pH = 8,0, 1 mM EDTA) aufgenommen.

10 μg pAT 153 werden ebenfalls in 200 μl Reaktionslösung mit je 20 Einheiten BamHI und PstI geschnitten, und die zwei entstehende Fragmente separiert. Von pAT 153 isoliert man das größere, den Replikationsursprung enthaltende Fragment. Jeweils 0,5 μg der gereinigten DNA Fragmente werden in 20 μl Reaktionslösung (68 mM Tris, pH = 7,5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol (DTT), 1 mM EDTA, 1 mM Adenosintriphosphat (ATP)) mit 5 Einheiten T₄ DNA-Ligase ligiert. Anschließend werden 150 μl kompetente E. coli HB 101-Bakterien (F⁻, hsdS 10(r⁻, m⁻), recA 13, ara-14, proA 2, lacY 1, galK 2,

rpsL20(Smr), xyl-5, mtl-1, supE44, lambda⁻) mit 1 µl der Ligasereaktion versetzt, 30 Minuten bei 0°C inkubiert, und durch 2 Minuten 42°C Inkubation mit der DNA transformiert (Kompetente E. coli Bakterien: E. coli wird in LB-Medium (10g/l Trypton, 5g/l Extract, 5g/l NaCl, pH = 7,5) bis zu OD_{600nm} = 0,3 wachsen gelassen und abzentrifugiert. Die Bakterien werden in 0,5 Vol eiskalter 50 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert und 30 Minuten inkubiert. Nach erneutem Abzentrifugieren werden die Bakterien in 1/5 Vol des Ausgangsvolumens 50 mM CaCl₂ resuspendiert. Die Bakteriensuspension wird auf LB-Agar (LB-Medium plus 15g/l Agar) mit 50 µg/ml Ampicillin plattiert. Nach 16 Stunden Inkubation bei 37°C werden 12 der entstandenen Kolonien ausgewählt und von diesen im Mikromaßstab die Plasmide isoliert (Birnboim, H. C. and Doly, J., Nucl. Acids Res. 7, 1513 [1979]). Die Richtigkeit der Konstruktion wird durch Restriktionsenzymdoppelverdauung mit PstI-BamHI, PstI-PvuII und EcoRI-BamHI und mit anschließender Gelelektrophorese durch das Auftreten der erwarteten Fragmente bestätigt. Ein Plasmid wird ausgewählt und mit parpATER33 bezeichnet. E. coli transformiert mit parpATER33 zeigt den Phänotyp Ap^r (Ampicillin-Resistenz), Tc^r (Tetracyclin-Resistenz).

Beispiel 2

Herstellung von pRHW 14

10 µg parpATER33 werden in 150 µl Reaktionslösung mit HindIII und BamHI doppelt verdaut. Die drei resultierenden DNA Fragmente werden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, und das größte, etwa 3750 Basenpaare (bp) lange Fragment isoliert (Fragment a). Dieses Fragment trägt den Tryptophan Promotor/Operator (*Serratia marcescens*), den Replikationsursprung, sowie das Ap^r-Gen.

10 µg pRHW 12 werden ebenfalls in 150 µl Reaktionslösung mit BamHI und HindIII doppelt verdaut. Die zwei entstehenden Fragmente werden gelelektrophoretisch aufgetrennt, und das kleinere, etwa 800 bp lange Fragment isoliert, welches das IFN-omegal[Gly]-Gen enthält (Fragment b).

40 ng Fragment a) werden mit etwa 50 ng Fragment b) in 10 l Reaktionslösung mit 5 Einheiten T₄ DNA-Ligase ligiert.

200 µl kompetenter E. coli HB 101 Suspension werden in der Ligasereaktionslösung gemischt, die Bakterien durch Hitzeschock auf 42°C transformiert und auf LB-Agar plus 50 µg/ml Ampicillin plattiert. Nach 16 Stunden Inkubation bei 37°C werden sechs Kolonien ausgewählt, und aus den Bakterien im Mikromaßstab das Plasmid DNA isoliert. Nach dem Verdauen der DNA mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI, HindIII, NcoI bzw. PstI und anschließender gelelektrophoretischer Analyse der Fragmente zeigte sich, daß eines der Plasmide die gewünschte Struktur aufweist. Dieses Plasmid wird mit pRHW 14 bezeichnet. E. coli transformiert mit pRHW 14 zeigt den Phänotyp Ap^r und Tc^r.

Beispiel 3

Nachweis der Plasmid-kodierten Proteine

Der Nachweis Plasmid-kodierter Proteine ist im Maxizell- System möglich (Sancar, A., Hack, A. M. and Rupp, W. D., J. Bacteriol. 137, 692–693 [1979]).

Hierzu wird E. Coli CSR603 (F⁻, thr-1, leuB6, proA2, phr-1, recA1, argE3, thi-1, uvrA6, ara-14, lacY1, galK2, xyl-5, mtl-1, gyrA98 [nalA98], rpsL31, tsx-33, lambda⁻, supE44), transformiert mit den Plasmiden pRHW12 und pRHW14. Im Expressionsmedium (10g/l (NH₄)₂PO₄, 3,5g/l KH₂PO₄, pH = 7,3, 0,5g/l NaCl, 21g/l Caseinhydrolysat (säurehydrolysiert, vitaminfrei), 11g/l Glucose, 1mM MgSO₄, 0,1mM CaCl₂, 1mg/l Thiamin-HCl, 20mg/l L-Cystein, 100mg/l Ampicillin) bis zu einer Dichte von OD_{600nm} = 0,6 bei 37°C gezüchtet. 10ml Kultur werden in einer offenen Petrischale mit einer UV-Germicidlampe (15W) aus 50cm Entfernung 5 Sekunden lang bestrahlt und eine Stunde weiter inkubiert. Den Kulturen werden 100 µg D-Cycloserin zugesetzt, um noch vermehrungsfähige Bakterien abzutöten. Nach 16 Stunden Inkubation bei 37°C werden die Bakterien abzentrifugiert, zweimal mit je 5ml Hershey-Salzlösung gewaschen (5,4g/l NaCl, 3,0g/l KCl, 1,1g/l NH₄Cl, 15mg/l CaCl₂ × 2H₂O, 0,2g/l MgCl₂ × 6H₂O, 0,2mg/l FeCl₃ × 6H₂O, 87mg/l KH₂PO₄, 12,1g/l Tris pH = 7,4), in 5ml Hershey-Medium (pro 100ml Hershey-Salze: 2,0ml 20% Glucose, 0,5ml 2% Threonin, 1,0ml 1% Leucin, 1,0ml 2% Prolin, 2% Arginin, 0,1ml 0,1% Thiamin-HCl) plus 20 µg/ml Indolacrylsäure (IAA) inkubiert. Durch Zusatz von 5 µCi/ml ³⁵S-Methionin und weiterer Inkubation bei 37°C für eine Stunde werden neusynthetisierte Proteine radioaktiv markiert. Die Bakterien werden abzentrifugiert und in 200 µl Na-Dodecylsulfat(SDS)-Probenpuffer (6,6mM Na-Phosphat pH = 6,8, 2mM EDTA, 2% SDS, 3% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, 0,66% 2-Mercaptoäthanol) 5 Minuten bei 100°C lysiert. Die Proben werden anschließend in einem 15%igem Polyacrylamidgel aufgetrennt (Trenngel: 15% Acrylamid, 0,4% Bisacrylamid, 375mM Tris pH = 8,8, 2mM EDTA, 0,1% SDS; Sammelgel: 6% Acrylamid, 0,16% Bisacrylamid, 375mM Tris pH = 6,8, 2mM EDTA, 0,1% SDS; Elektrodenpuffer: 3,0g/l Tris, 14,24g/l Glyzin, 0,335g/l EDTA, 0,5g/l SDS; Elektrophoresedauer: 16 Stunden bei konstant 20mA). Das Gel wird eine Stunde in 20% Methanol, 7,5% Essigsäure fixiert, 30 Minuten in 5% Methanol, 1% Glycerin inkubiert und in einem Geltrockner getrocknet. Das Gel wird unter Verwendung einer Verstärkerfolie (Kodak) bei -80°C auf Kodak X-Omat S Röntgenfilm exponiert.

Das Ampicillin-Resistenzgenprodukt (β-Lactamase) wird in beiden Fällen gleich stark markiert. IFN-omegal ist jedoch im Falle des pRHW14 mehr als doppelt so stark markiert als bei pRHW12 (siehe Figur 3).

Beispiel 4

Extraktion von IFN-omegal[Gly] aus Bakterien

E. coli HB 101 transformiert mit pRHW12 bzw. pRHW14 wird in Expressionsmedium plus 20 µg/ml IAA bis zu einer OD_{600nm} = 20 angezüchtet. Die Bakterien werden durch Zusatz von H₂SO₄ bis pH = 2 und 60minütige Inkubation bei 20°C abgetötet. Die Bakterien werden abzentrifugiert, und die Biomasse bei -20°C bis zur Aufarbeitung eingefroren. Die Bakterien werden in 10 Vol. 1% Essigsäure resuspendiert. Der pH-Wert der Lösung wird durch Zusatz von 2N NaOH auf 10 eingestellt und die Suspension bei 0°C zwei Stunden gerührt. Danach wird mit 2N HCl wieder ein pH-Wert von 7,5 eingestellt und die Zelltrümmer abzentrifugiert (J2-21-Zentrifuge [Beckmann], JA10 Rotor, 4°C, 10000rpm, 30 Minuten). Die Interferon-Aktivität im Überstand (Rohextrakt) wird mittels des Cytopathischen Effektes (CPE) Reduktionstests auf humanen A549-Zellen (menschliche Lungenkarzinom-Zelllinie), mit Encephalomyocarditis (EMC) Virus infiziert, unter Verwendung von IFN-α2(Arg) als Standard gemessen. Dabei liefert die Biomasse von E. coli transformiert mit pRHW12 100000 Einheiten/Gramm (Mittelwert aus drei unabhängigen Züchtungen), während der Klon pRHW14 200000 Einheiten/Gramm Biomasse (15 Züchtungen) liefert.

Beispiel 5

Konstruktion des Hybridinterferon Expressionsklons pRH72

10 µg parpATER33 bzw. pRH714 werden in je 130 µl Lösung mit BglII und SphI doppelt verdaut. Die entstandenen Fragmente werden auf einem 0,8% Agarosegel aufgetrennt, die DNA's eluiert und durch Präzipitation gereinigt. Die Fragmente werden in 20 µl TE gelöst. Das Expressionsplasmid für IFN-α2/omega1 (BgIII) wird durch Ligasereaktion von 1 µl großem Fragment aus parpATER33 mit 5 µl kleinem Fragment von pRH714 in insgesamt 20 µl unter Verwendung von 5 Einheiten T₄ DNA-Ligase hergestellt. Nach der Transformation von E.coli HB 101 werden die Plasmide einiger der resultierenden, ampicillinresistenten Klone im Mikromaßstab isoliert, und die Richtigkeit der Konstruktion durch doppelte Restriktionsenzymverdauung mit BglII/SphI überprüft. Eines der Plasmide wird ausgewählt und mit pRH72 bezeichnet. E.coli transformiert mit diesem Plasmid besitzt den Phänotyp Ap^r, Tc^r.

Beispiel 6

Konstruktion der Plasmide pRH78r und pRH78f

1 µl des großen Fragments von pRH714 wird mit 5 µl des BgIII(2)-SphI-Fragments aus parpATER33, das den C-Terminus des IFN-α2(Arg) kodiert, in 20 µl Reaktionslösung mit 5 Einheiten T₄ DNA-Ligase ligiert. Mit dem entstehenden Plasmid wird E.coli HB 101 transformiert und wie in Beispiel 5 beschrieben, ein Plasmid der gewünschten Konstruktion ausgesucht. Dieses Zwischenplasmid wird mit pRH77 bezeichnet. Um das Gen für das Hybridinterferon-omega1/α2(BgIII) zu komplettieren, muß das beim Schnitt von parpATER33 mit BgIII entfernte Fragment in pRH77 eingebracht werden. Hierzu werden 10 µg pRH77 in 50 µl Lösung mit BgIII geschnitten, das Volumen der Lösung mit 2× CIP-Puffer verdoppelt (CIP: Kaibsdarm-Phosphatase, 2× CIP-Puffer: 100 mM Tris pH = 9,0, 2 mM MgCl₂, 0,2 mM ZnCl₂), und das 5'-terminale Phosphat durch Zusatz von 1 Einheit CIP (Boehringer Mannheim) entfernt (60 Minuten 37°C). Die linearisierte Form von pRH77 wird durch Agarosegelelektrophorese und Elution der DNA mit aräzipitation gereinigt. Die DNA wird in 20 µl TE-Puffer aufgenommen und 1 µl davon mit 5 µl des 263-bp-Fragments (BgIII(1)-BgIII(2)-Fragment), das beim Verdauen des parpATER33 mit BgIII/SphI gewonnen wird, in insgesamt 10 µl Reaktionslösung mit 5 Einheiten T₄ DNA-Ligase ligiert. E.coli HB 101 wird transformiert, und die DNA von sechs entstandenen Kolonien analysiert. Da die Insertion des 263 bp Fragments auf Grund der identischen Enden in zwei Orientierungen erfolgen kann, werden die Plasmide mit den Restriktionsendonukleasen AluI und HaeIII auf die Richtigkeit der Konstruktion hin untersucht. Das Plasmid, in dem das BgIII-Fragment in der für die Expression richtigen Lage insertiert wurde, wird mit pRH78r, jenes mit der für Expression falschen Orientierung mit pRH78f bezeichnet. E.coli transformiert mit pRH78r bzw. pRH78f zeigt den Phänotyp Ap^r, Tc^r.

Beispiel 7

Lysatstest zur Feststellung von Interferon-(antiviraler) Aktivität

E.coli transformiert mit den diversen Plasmiden wird in 35 ml Expressionsmedium plus 20 µg/µl IAA bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} = 0,6 angezüchtet. Die Bakterien werden abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 3,5 ml 50 mM Tris pH = 7,5/30 mM MgCl₂-Lösung aufgenommen und unter Eiskühlung mit einem Ultraschall-Desintegrator (MSE, Soniprep 150) mit maximaler Leistung beschallt. Die Suspension wird 10 Minuten zentrifugiert (J2-21-Zentrifuge, 10000 rpm, 4°C, JA 20-Rotor), und der Überstand steril filtriert. Die antivirale Aktivität der Lösung wird mittels des CPE-Reduktionstests (A549-Zellen, EMC-Virus) bestimmt.

E.coli transformiert mit pRH72 (IFN-α2/omega1(BgIII)) ergibt keine antivirale Aktivität ebenso wie E.coli transformiert mit pRH78f, das die ersten 64 Aminosäuren von reifen IFN-omega1, gefolgt von einem Serin kodiert.

Demgegenüber zeigt das IFN-omega1/α2(BgIII), wobei der Klon pRH78r etwa 30 × 10⁶ Einheiten Interferon (verglichen mit IFN-α2(Arg) als Standard) pro Liter Kultur und pro 1 OD_{600nm} Bakteriendichte produziert, eine etwa viermal höhere spezifische antivirale Aktivität auf A549-Zellen als IFN-α2(Arg).

In der folgenden Tabelle sind die Aminosäureänderungen des Hybridinterferons IFN-omega1/α2(BgIII) gegenüber IFN-α2(Arg) aufgelistet:

Position	IFN-α2(Arg)	IFN-omega1/α2	Übergang
7	Thr	Asn	p >> p
9	Ser	Gly	p >> p
11	Gly	Leu	p >> l
14	Arg	Asn	b >> p
17	Met	Val	(1) >> l
20	Ala	His	l >> b
27	Leu	Pro	l >> l
29	Ser	Leu	p >> l
38	Gly	Arg	p >> b
43	Glu	Met	a >> (1)
44	Phe	Val	ar >> l
46	O	Lys	O >> b
47	Asn	Ser	p >> p
49	Phe	Leu	ar >> l
53	Glu	His	a >> b
54	Thr	Val	p >> l
55	Ile	Met	l >> (2)
56	Pro	Ser	l >> p
62	Ile	Leu	l >> l

Legende:

a: sauer, ar: aromatisch, b: basisch, l: apolar, p: polar

O: keine Aminosäure an dieser Position

Unterschiede bei den Ladungen (Position):

- 1) Verlust von 1 positiven Ladung: 14
- 2) Gewinn von 4 positiven Ladungen: 20, 38, 45, 53
- 3) Verlust von 2 negativen Ladungen: 43, 53

Das Hybrid hat 5 positive Ladungen mehr als IFN- α 2(Arg).

Beispiel 8

Reinigung des IFN- ω 1/ α 2(Bg1II)

145g säurebehandelte und bei -20°C gefrorene E.coli des Klones HB 101/pRH 78r werden in 1450ml 1% Essigsäure bis zur völligen Verteilung des Materials unter Eiskühlung gerührt (etwa 30 Minuten) und sodann 2×1 Minute lang mit dem Ultra-Turrax T45/6 (Janke und Kunkel) bei 10000 UpM homogenisiert. Anschließend wird Polymyxin P (Serva, Kat. Nr. 33141) bis zu einer Konzentration von 0,25% zugegeben und der pH mit 5N NaOH auf 10,0 eingestellt. Nach 2 Stunden Rühren unter Eiskühlung wird der pH mit 5N HCl auf 7,5 eingestellt und eine Klärung des Rohextraktes durch Zentrifugation vorgenommen (Christ Cryofuge 6-6S, 3000 UpM, 1 Stunde, etwa 4°C).

Zur Fällung des Interferons wird der Rohextrakt mit 430g/Liter Ammoniumsulfat versetzt und zur vollständigen Fällung 16 Stunden bei $4-8^{\circ}\text{C}$ stehen gelassen. Der Niederschlag wird dann durch Zentrifugation gewonnen (Beckman Zentrifuge J 2-21, Rotor JA 10, 10000 UpM, 60 Minuten, $4-8^{\circ}\text{C}$). Das Ammonsulfat-Pellet wird in 145ml 0,01 M NaCl aufgenommen und die Suspension mit 5N NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Nach 3 Stunden Rühren (Eiskühlung) wird die Lösung klarzentrifugiert (Beckman J 2-21, Rotor JA 10, 10000 UpM, 4°C , 60 Minuten) und mit Hilfe einer Nephross-Allegro Dialysierpatrone (Fa. Organon) gegen 0,01 M NaCl solange dialysiert, bis die Interferonlösung eine Osmolarität von 370 mOsmol/l aufwies. Tandem-Chromatographie: Zur chromatographischen Reinigung wird eine Säule aus 75g DE-52 Zellulose (Whatman) mit 0,025 M Tris/HCl + 0,2 M NaCl, pH 7,5 äquilibriert und vor eine Affinitätssäule (80ml) vorgeschaltet, die den monoklonalen Antikörper EBI-1 (siehe EP-A-0.119.476), gekuppelt an Sepharose 4B (mit Hilfe von BrCN-aktivierter Sepharose 4B, Pharmacia, hergestellt) enthält. Die Affinitätssäule enthält 480mg des monoklonalen Antikörpers EBI-1, sie wird ebenfalls mit Tris/HCl + NaCl pH 7,5 wie oben beschrieben äquilibriert. Die Interferonlösung wird durch die beiden Säulen gepumpt und solange mit 0,025 M Tris/HCl + 0,2 M NaCl nachgewaschen, bis im Eluat nur mehr eine Extinktion $\text{OD}_{280\text{nm}}$ von unter 0,1 gemessen wird. Danach wird die Vorsäule (DE-52-Zellulose) abgekuppelt, und die EBI-1-Säule solange weiter gewaschen, bis das Eluat proteinfrei ist ($\text{OD}_{280\text{nm}}$ im Eluat unter 0,01). Das adsorbierte Interferon wird nunmehr mit Hilfe von 0,1 M Zitronensäure in 25%igem Äthylenglykol eluiert. Der Proteinpeak wird gesammelt.

Das saure Eluat der Antikörpersäule wird mit 2N Ammoniak auf pH 4,5 eingestellt, und der entstandene Niederschlag abzentrifugiert.

Die letzte Reinigungsstufe ist eine Ionenaustausch-Chromatographie an dem Träger MONO-S (Pharmacia). Eine Säule von 1ml Bettvolumen (HR5/5) wird an eine FPLC-Apparatur angeschlossen (Pharmacia) und in 0,1 M Na-Citrat pH 4,2 äquilibriert. Die IFN-Lösung wird aufgetragen, und das adsorbierte Interferon mit Hilfe eines pH-Gradienten eluiert (Puffer A: 0,1 M Na-Citrat pH 4,2 und Puffer B: 0,1 M Na-Phosphat pH 8,0). Das Interferon- ω 1 wird bei einem pH von 7,0 eluiert und der IFN-Peak gesammelt (siehe Fig. 6).

Übersicht über die Reinigung von IFN- ω 1/ α 2(BgIII)

Ausgangsmaterial: 145g E.coli HB 101/pRH 79r

	Voi. (ml)	IFN* (Einh.)	Protein** (mg)	Einh. (mg)	Ausb. (%)
Rohextrakt	1470	$16,5 \times 10^6$	3000	$5,6 \times 10^6$	100
nach Fällung Ammoniumsulfat u. Dialyse	246	$14,0 \times 10^6$	1970	$7,1 \times 10^6$	83
Eluat der Antikörpersäule	11,1	$10,3 \times 10^6$	12,9	800×10^6	61
Überstand pH 4,5	11,9	$7,4 \times 10^6$	3,3	800×10^6	44
Pool nach MONO-S	6,9	$4,6 \times 10^6$	7,0	660×10^6	27

* Die Bestimmung des Interferon-Gehalts erfolgt durch Messung der antiviralen Aktivität (CPE-Reduktionstest) mit Hilfe von A549-Zellen und Encephalomyocarditis-Virus (EMC-Virus). Als Standard dient IFN- α 2(Arg).

** Die Proteinbestimmung erfolgt mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays. Der Standard war Serumalbumin.

Beurteilung der Reinigung

Das gereinigte Hybridinterferon- ω 1/ α 2(BgIII) ist homogen (siehe hierzu Fig. 7 – Gelpermeations-HPLC). Die erreichte spezifische Aktivität von etwa 800×10^6 Einheiten/mg Protein ist höher als die von IFN- α 2(Arg) (etwa 300×10^6 Einheiten/mg Protein).

Beispiel 9

Herstellung eines monoklonalen Antikörpers gegen HuIFN- ω 1

a) Immunisierung:

Zwei weibliche, etwa acht Wochen alte Balb/c-Mäuse werden mit hochgereinigtem IFN- ω 1/ α 2(BgIII) (Reinheit $> 95\%$, gelöst in 0,1 M Natriumphosphat/Natriumcitrat pH 7) wie folgt immunisiert:

1. Immunisierung: 100 μg IFN- ω 1/ α 2(BgIII) in einer Emulsion mit komplettem Freund's Adjuvans, intraperitoneal injiziert.
2. Immunisierung: 100 μg IFN- ω 1/ α 2(BgIII) in einer Emulsion mit inkomplettem Freund's Adjuvans, ein Monat nach der ersten Immunisierung intraperitoneal injiziert

Zehn Tage nach der zweiten Immunisierung werden Blutproben gewonnen. Die Fähigkeit der Seren, die antivirale Aktivität von HuIFN- ω 1, HuIFN- α 2(Arg) und IFN- ω 1/ α 2(BgIII) zu neutralisieren, wird wie folgt getestet:

100 μl einer Verdünnung der Serumprobe in Zellkulturmedium werden mit 100 μl einer IFN-Lösung (jeweils 100 antivirale Einheiten/ml) in Zellkulturmedium gemischt und 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die antivirale Aktivität der Proben im biologischen Test (A549 Lungenkarzinomzellen, Encephalomyocarditis Virus) bestimmt:

Serum- verdünnung	Maus 1			Maus 2		
	omega1	α2(Arg)	omega1/α2	IFN-Präparat		omega1/α2
1:100	+	+	+	—	—	+
1:1000	—	—	+	—	—	+/-
1:10000	—	—	—	—	—	—

Symbole: + vollständige Neutralisierung, +/- partielle Neutralisierung, — keine neutralisierende Wirkung

Vier Wochen nach der zweiten Immunisierung erhält Maus 1 eine intravenöse Injektion von weiteren 100 µg IFN-omega1/α2(BgIII). Drei Tage später wird die Milz entnommen und zur Herstellung von Hybridomen eingesetzt.

Drei Wochen nach der zweiten Immunisierung wird Maus 2 neuerlich immunisiert; 100 µg IFN-omega1/α2(BgIII) werden intraperitoneal, 100 µg IFN-omega1/α2(BgIII) subkutan appliziert. Zwei Wochen später wird eine weitere Serumprobe gewonnen, die im oben beschriebenen Test bei einer Verdünnung von 1:100 eine partiell neutralisierende Wirkung für HufN-omega1 zeigt. Vier Wochen nach der dritten Immunisierung wird eine intravenöse Injektion von 100 µg IFN-omega1/α2(BgIII) gegeben, vier Tage später die Milz entnommen und zur Herstellung von Hybridomen eingesetzt.

b) Herstellung und Screening von Hybridomen

Die Herstellung von Hybridomen erfolgt nach der ursprünglich von Köhler und Milstein (Nature 256, 495 [1975]) entwickelten Methode unter Verwendung der nichtsezernierenden Zelllinie P3X63Ag8.653 (Kearney et al., J. Immunol. 123, 1548 [1979]). Zur Fusion wird 50% Polyäthylenglykol 4000 mit 5% Dimethylsulfoxid eingesetzt. Die Selektion der Hybridzellen in HAT-Medium erfolgt ebenfalls mit Hilfe bekannter Verfahren (siehe Monoclonal Antibodies: Production and Maintenance, Lovborg, U. William Heinemann Medical Books, London 1982; Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet, R. H., McKearn, T. J., and Bechtol, K. B., Herausgeber: Plenum Press, New York and London 1980). Aus beiden Fusionen werden insgesamt 730 Hybridomkulturen erhalten. Das Screening wird wie folgt durchgeführt:

Kulturbestände von mindestens 10–20% konfluenten Hybridomkulturen werden im gleichen Volumina einer Lösung von HufN-omega1 (20 antivirale Einheiten/ml) gemischt, 90 Minuten bei 37°C inkubiert und anschließend auf ihre antivirale Aktivität getestet. Alle Kulturen werden in Abständen von jeweils einer Woche mindestens zweifach getestet. Nur eine der 730 Hybridomkulturen zeigt in allen Tests konsistent eine Reduktion der antiviralen Aktivität. Diese Kultur, im folgenden OMG-2 genannt, wird durch limitierende Verdünnung subkloniert, die Subklone erneut im beschriebenen Testverfahren auf Aktivität getestet. Mehrere positive Subklone werden in mit Pristan vorbehandelte Mäuse inokuliert. Einer der Subklone führte in allen Mäusen zur Bildung von Antikörper enthaltender Ascites-Flüssigkeit. Durch Fällung mit 50% gesättigter Ammonsulfatlösung wird der enthaltene Antikörper partiell gereinigt. Das resultierende Präparat enthält Antikörper in etwa 78%iger Reinheit (bestimmt durch Gelpermeations-Hochdruckflüssigkeitschromatographie). Etwa 10 mg Antikörper können aus einem Milliliter Ascites-Flüssigkeit gewonnen werden. Eine weitere Reinigung bis zu einer Reinheit von über 95% wird durch Anionen-Austausch-Chromatographie erzielt.

c) Charakterisierung des Antikörpers OMG-2

In der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese unter nicht reduzierenden Bedingungen zeigt der Antikörper OMG-2 ein Molekulargewicht von etwa 150000. In der Gelpermeations-Hochdruckflüssigkeitschromatographie zeigt der Antikörper ein mit einem IgG-Markerprotein identisches Retentionsverhalten. Der Antikörper ist somit wahrscheinlich vom IgG-Typ. Im Neutralisationstest (siehe Beispiel 10b) werden mit einem durch Ammonsulfat-Fällung partiell (siehe Beispiel 10b) gereinigten Antikörper folgende Ergebnisse erhalten:

Antikörper-Konzentration µg/ml	IFN-Präparation		
	omega1	alpha2	omega1/α2
5000	+/-	+/-	
1000	—	—	+
100	—	—	+
10	—	—	+/-
1		—	

Der Antikörper zeigt somit starke neutralisierende Wirkung gegen das zur Immunisierung der Mäuse eingesetzte Hybrid-IFN-omega1/α2(BgIII), aber nur eine etwa 500fach schwächere Wirkung gegen HufN-α2(Arg) und HufN-omega1. Trotz der offensichtlich relativ geringen Affinität zu HufN-omega1 kann der Antikörper OMG-2 erfolgreich für die Immunaффinitätschromatographie dieses Interferons eingesetzt werden (siehe Beispiel 11).

Beispiel 10

Reinigung von IFN-omega1

a) Extraktion und CPG-Chromatographie:

794 g säuregefällte und bei -20°C tiefgefrorene E.coli des Klones pRHW 14 werden in 7700 ml 1%iger Essigsäure unter

Eiskühlung bis zur völligen Verteilung des Materials gerührt (etwa 30 Minuten) und mit Hilfe von 2 N NaOH auf pH 10 eingestellt. Nach 2stündigem Rühren unter Eiskühlung wird die Suspension auf pH 7,5 eingestellt (2 N HCl) und klarzentrifugiert (1 Stunde bei 10000 UpM, 4°C, JA 10-Rotor der Beckman Zentrifuge J2–21). Der klare Überstand wird mit 50 ml/Stunde über eine 500-ml-Säule aus CPG gepumpt (controlled pore glass, CPG 10–350, 120–200 mesh, Electro-Nucleonics Inc, USA) und anschließend die Säule gründlich mit 0,025 M Tris/HCl + 1 M NaCl (pH 7,5) nachgewaschen. Das an der Säule adsorbierte Interferon wird sodann mit 0,025 M Tris/HCl + 1 M KSCN in 50%igem Äthylenglykol (pH 7,5) eluiert (50 ml/Stunde). Der IFN-Pool wird sodann gegen 0,025 M Tris/HCl + 0,1 M NaCl dialysiert, wobei durch Zugabe von 10 % Polyäthylenglykol 40000 zu der Außenlösung gleichzeitig eine Konzentrierung des IFN-Pools erreicht wird. Das dialysierte Konzentrat wird durch Zentrifugation geklärt (1 Stunde, 4°C, 15000 UpM, JA-20 Rotor der Beckman Zentrifuge J2–20).

b) Affinitätschromatographie an OMG 2-Sepharose

Gereinigter monoklonaler Antikörper OMG-2 wird mit Hilfe von BrCN-aktivierter Sepharose 4B nach der Vorschrift des Herstellers (Pharmacia) an den Träger Sepharose 4B gekuppelt. Hierbei werden 16 mg des monoklonalen Antikörpers pro Gramm aktivierte Sepharose 4B eingesetzt. Für die beschriebene Trennung wird eine Affinitätssäule von 8 ml Volumen verwendet.

Das nach Beispiel 11 a erhaltene Konzentrat der CPG-Säule wird mit 4 ml/Minute über die Affinitätssäule gepumpt und die Säule anschließend mit 0,025 M Tris/HCl + 0,1 M NaCl pH 7,5 solange gewaschen, bis das Eluat proteinfrei war (OD₂₈₀ nm des Eluates identisch mit der des Waschpuffers). Das gebundene Interferon wird sodann mit 2 ml/Minute mit Hilfe von 0,1 M Zitronensäure in 25 % Äthylenglykol eluiert und der Proteinpeak (OD₂₈₀ nm) gesammelt.

c) Ionenaustausch-Chromatographie an dem Träger MONO-S

Eingesetzt wird eine 1-ml-Säule (HR5/5) des Trägermaterials MONO-S (beide Pharmacia), die an eine FPLC-Apparatur (Pharmacia) angeschlossen war. Die Ionenaustauschersäule wird mit 0,1 M K-Phosphat pH 6,0 in 25 % Propylenglykol äquilibriert und das nach Beispiel 11 b erhaltene Eluat der Affinitätssäule mit 0,5 ml/Minute durchgepumpt. Das adsorbierte Interferon wird sodann mit Hilfe eines NaCl-Gradienten eluiert (Puffer B: 0,1 M K-Phosphat + 1 M NaCl pH 6,0 in 25 % Propylenglykol). Die Fraktionen (je 1 ml) werden auf Interferon-Aktivität getestet. Der erste Peak (OD₂₈₀ nm) bei 46 % Puffer B enthält das Interferon-omega (siehe Fig. 8).

d) Reverse-Phase-HPLC

Als stationäre Phase dient eine Bakerbond WP-RP-18-Säule, 4 × 250 mm, mit einem Partikeldurchmesser von 5 µm und einem Porendurchmesser von Å.

Als mobile Phase dient ein Gradient von Acetonitril in 0,1 % Trifluoressigsäure:

Puffer A: 0,1 % Trifluoressigsäure in Wasser,

Puffer B: 0,1 % Trifluoressigsäure in Acetonitril,

Gradient von 20–68 % B in 28 Minuten,

Fließrate: 1 ml/Minute,

Detection: OD₂₁₄ nm.

Es werden 630 µg des gemäß Beispiel 11 c erhaltenen Proteins (IFN-Pool nach MONO-S) aufgetragen. Das Eluat wird im Bereich von 48–65 % B getestet. Das Interferon-omega1 eluiert bei einer Retentionszeit von 24,5 Minuten und 63 % Puffer-B (siehe Fig. 9). Die Ausbeute beträgt 5 bis 10 µg, die spezifische Aktivität > 10⁸ Einheiten/mg Protein.

e) Bestimmung der N-terminalen Aminosäuresequenz

Der gemäß Beispiel 11 d erhaltene IFN-omega1-Peak (RP-HPLC) wird in einer Speedvac-Zentrifuge getrocknet und in einem Sequenzer des Typs 470 A (Applied Biosystems) analysiert. Folgende Aminosäuresequenz wird erhalten:

Xxx-Asp-Leu-Pro-Gln-Asn-Xxx-Gly-Leu-Leu-Ser-

1

5

10

Diese Sequenz bestätigt die aus der cDNA abgeleitete Reihenfolge der Aminosäuren. (Cystein an der 1. Stelle ist ohne Reduktion und Alkylierung des Proteins nicht nachweisbar und Histidin an der 7. Position konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden.)

Übersicht über die Reinigung von IFN-omega1:

1. Extraktion und CPG-Chromatographie

	Vol. (ml)	IFN* (Einh.)	Protein** (mg)	Einh. (mg)	Ausb. (%)
Rohextrakt	7700	190 × 10 ⁶	19100	9950	100
Pool nach CPG	425	53 × 10 ⁶	4600	11500	28
nach Dialyse	410	45 × 10 ⁶	1650	27300	24

2. Affinitätschromatographie an OMG 2-Sepharose

	Vol. (ml)	IFN* (Einh.)	Protein** (mg)	Einh. (mg)	Ausb. (%)
aufgetragen	350	40,8 × 10 ⁶	1520	26700	100
nicht adsorbiert	440	4,5 × 10 ⁹	–	–	11
Eluat IFN-omega	7	25,6 × 10 ⁶	2,84	9,0 × 10 ⁶	63

3. Ionenaustausch-Chromatographie an MONO-S

	Vol. (ml)	IFN* (Einh.)	Protein** (mg)	Einh. (mg)	Ausb. (%)
aufgetragen	7	7,14 × 10 ⁶	2,84	2,5 × 10 ⁶	100
IFN omega-Pool	2	3,04 × 10 ⁶	0,72	4,2 × 10 ⁶	43

* Die Bestimmung des Interferongehaltes durch die Messung der antiviralen Aktivität (CPE-Reduktions-Test) mit Hilfe von A549-Zellen und Encephalo-myocarditis-Virus (EMC-Virus). Standard: rIFN-α2(Arg). Es handelt sich hierbei um den Mittelwert dreier unabhängiger Tests.

** Die Proteinbestimmung erfolgt mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays. Der Standard ist Serumalbumin.

Fig. 1

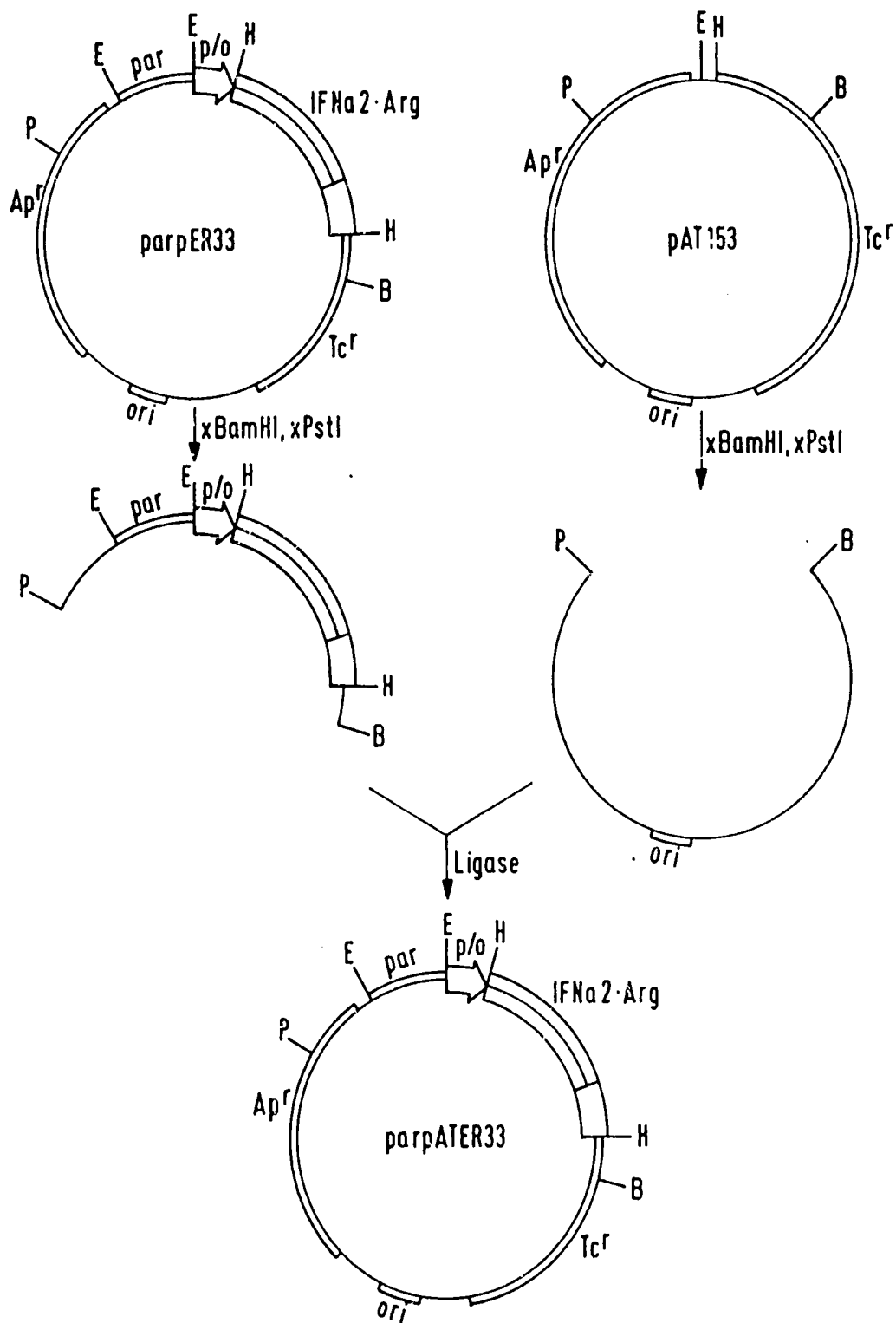


Fig. 2

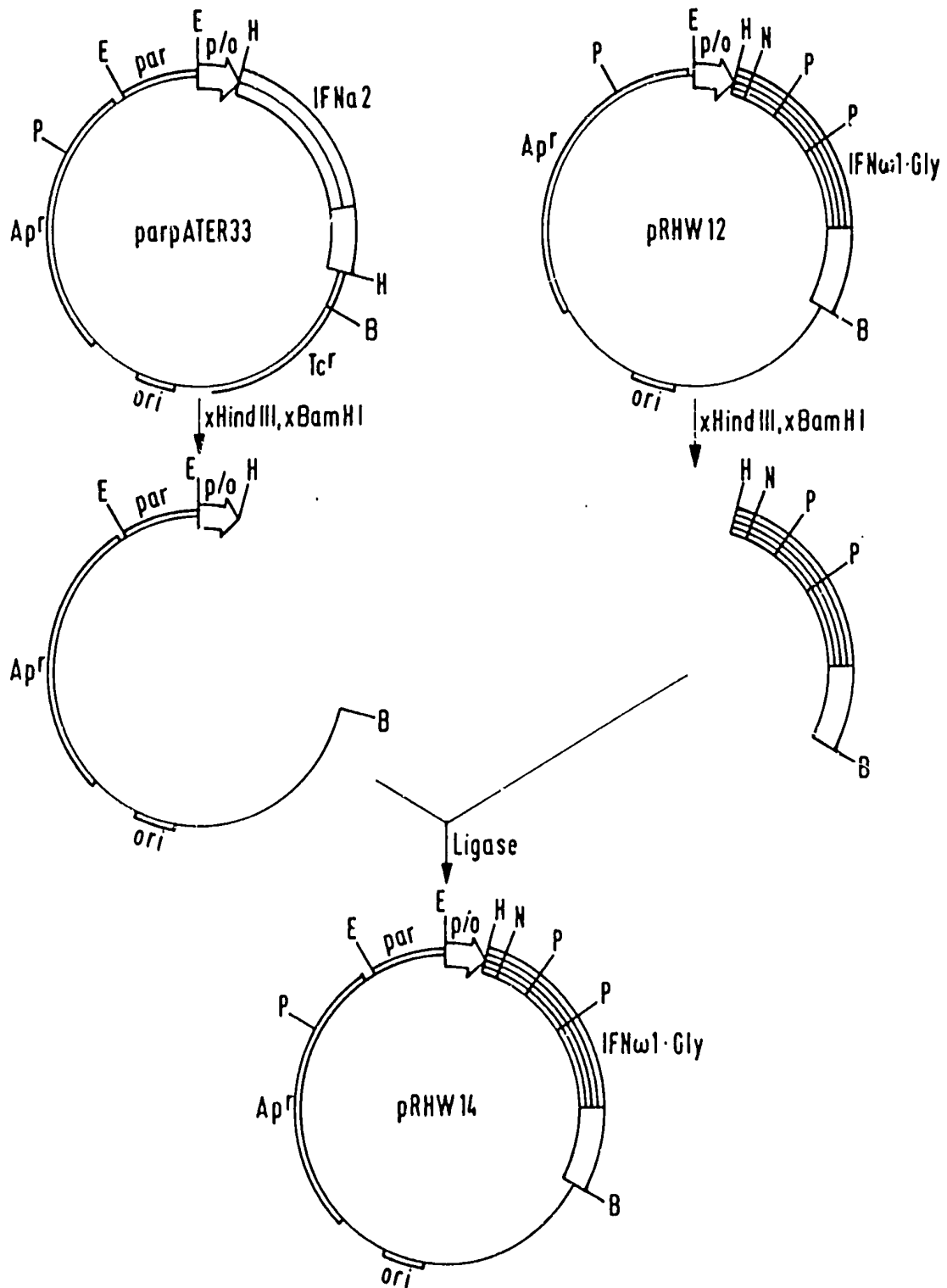


Fig. 3

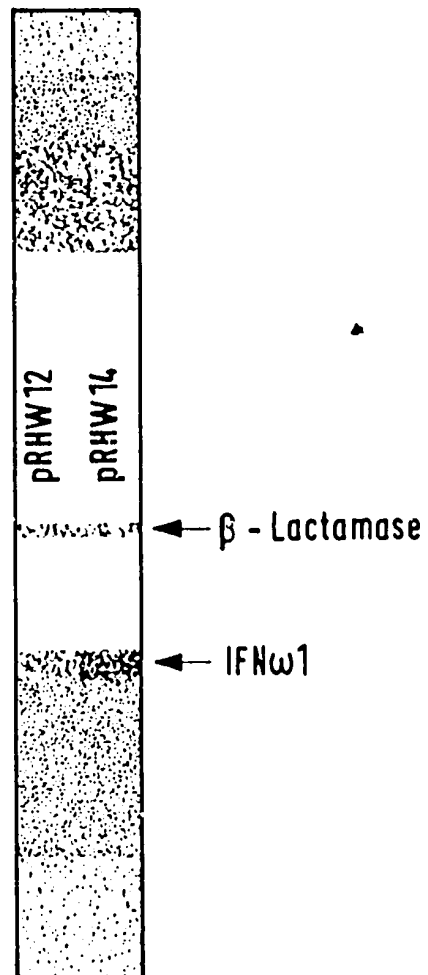


Fig. 4

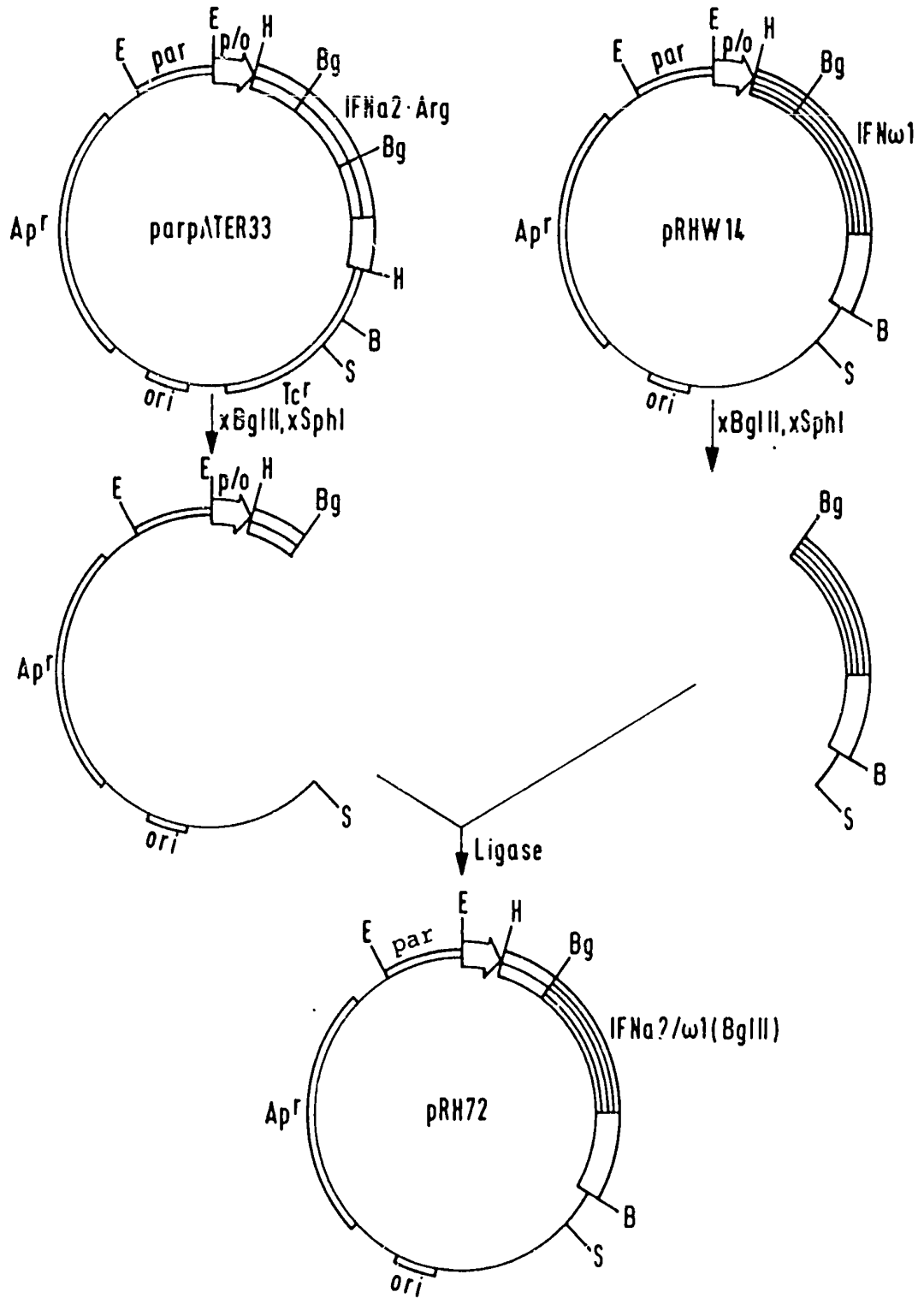


Fig. 5

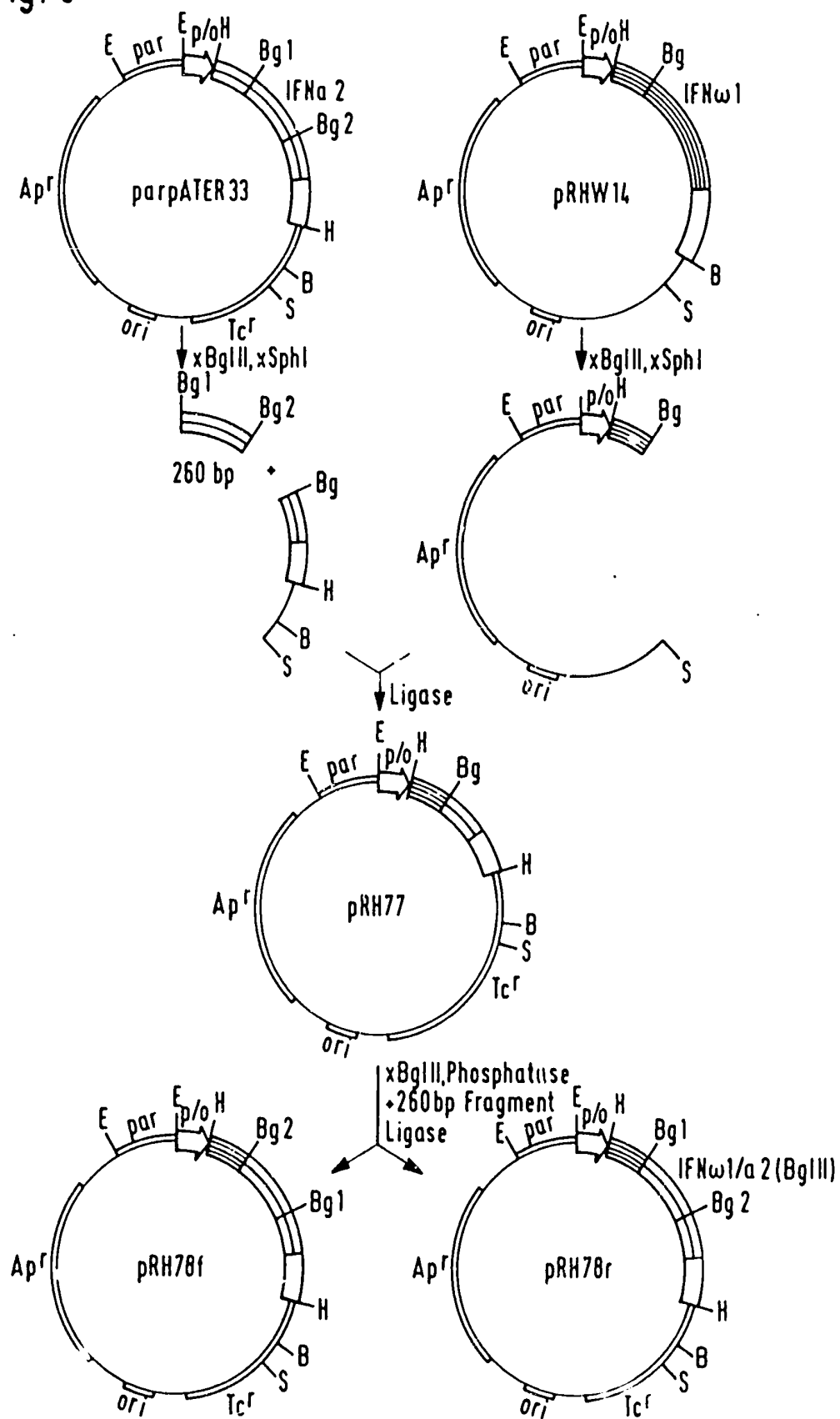


Fig. 6

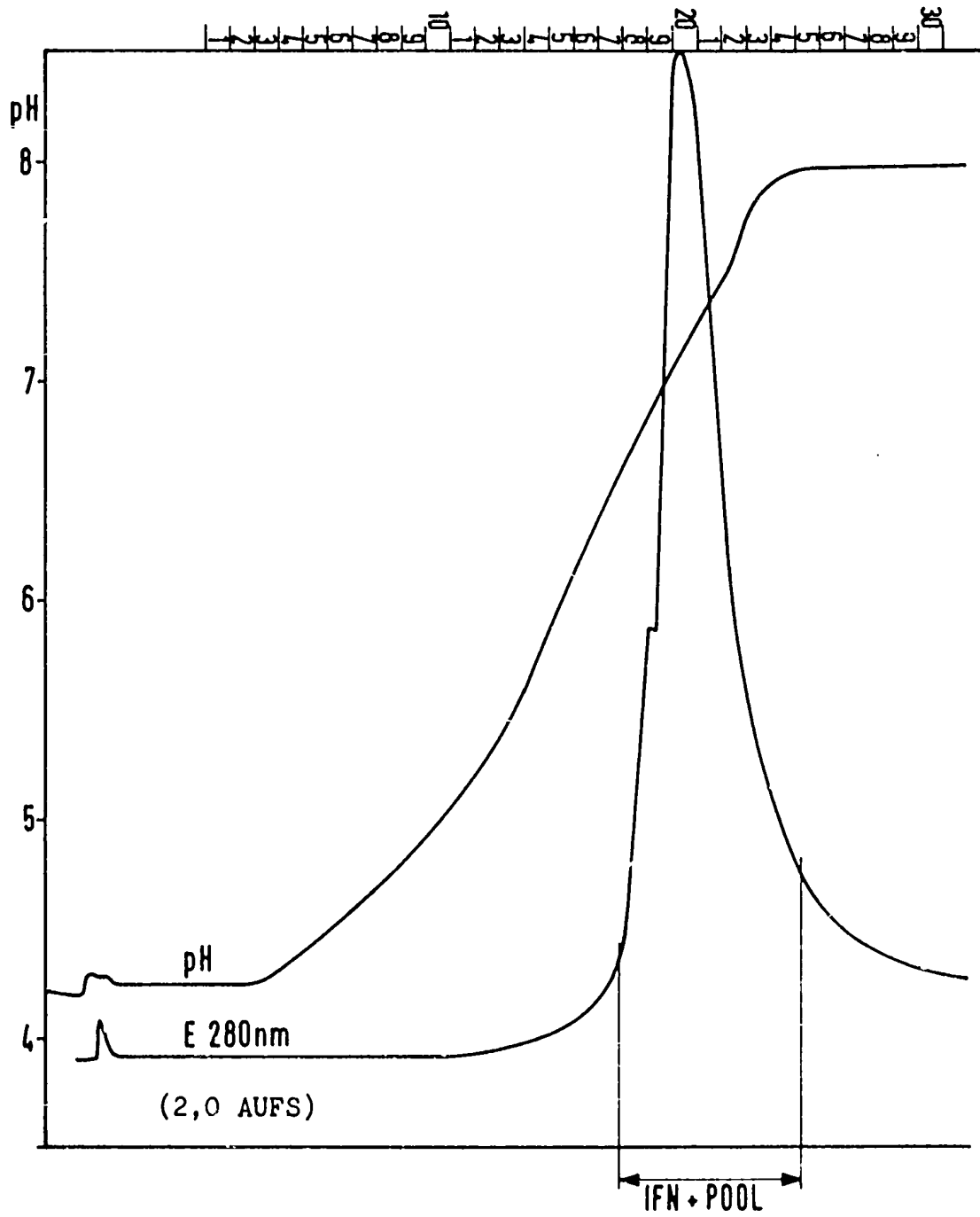


Fig. 7

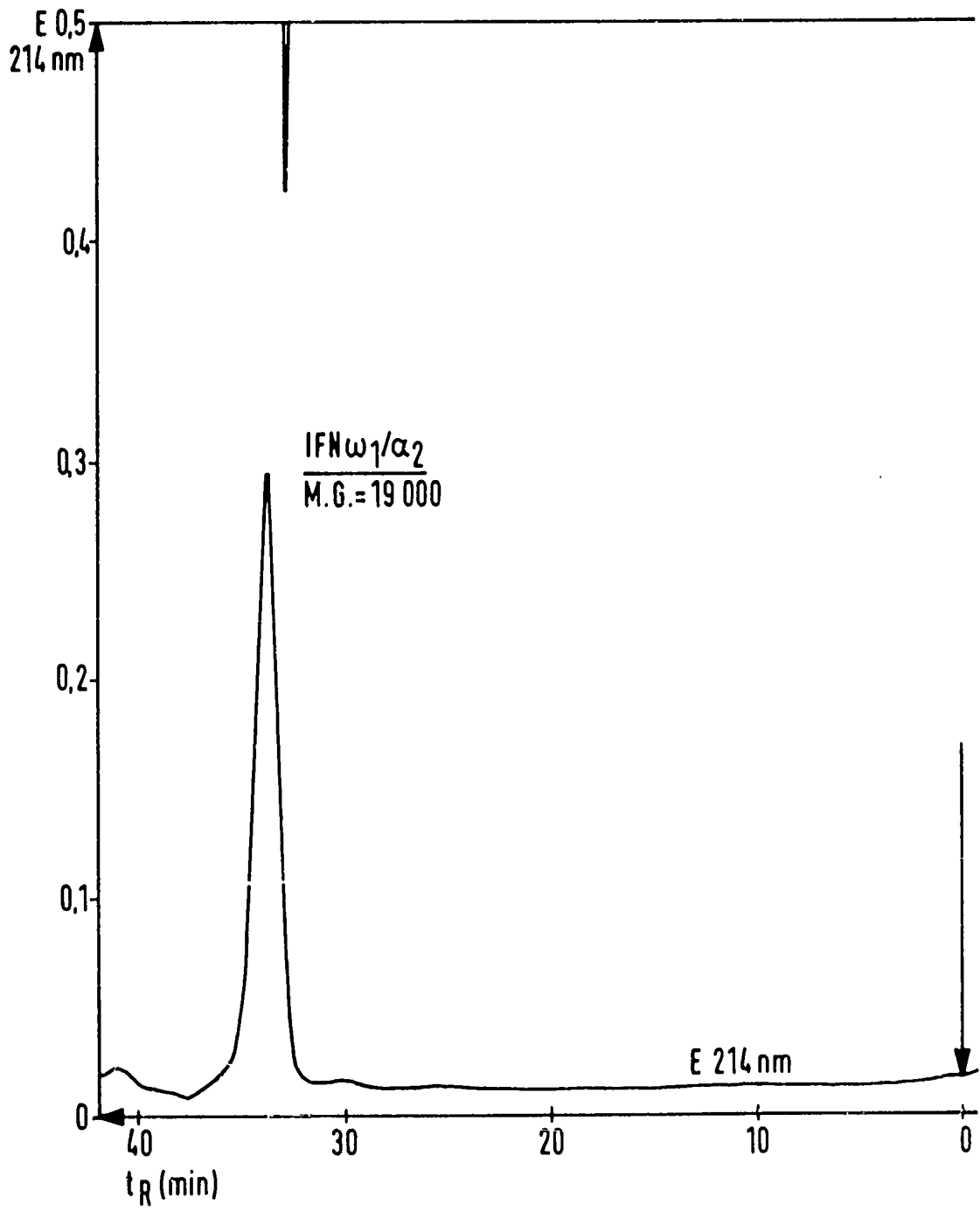
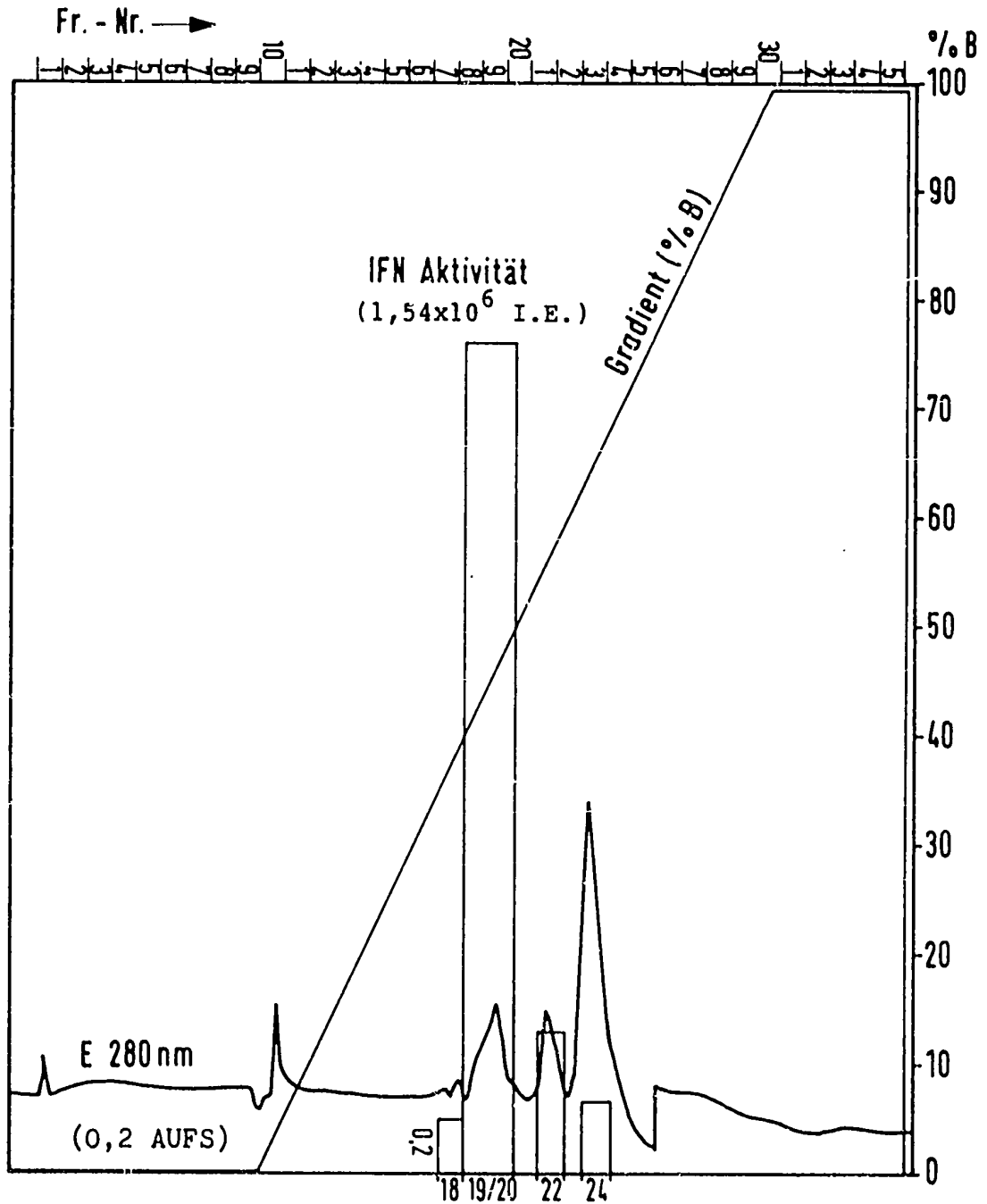


Fig. 8



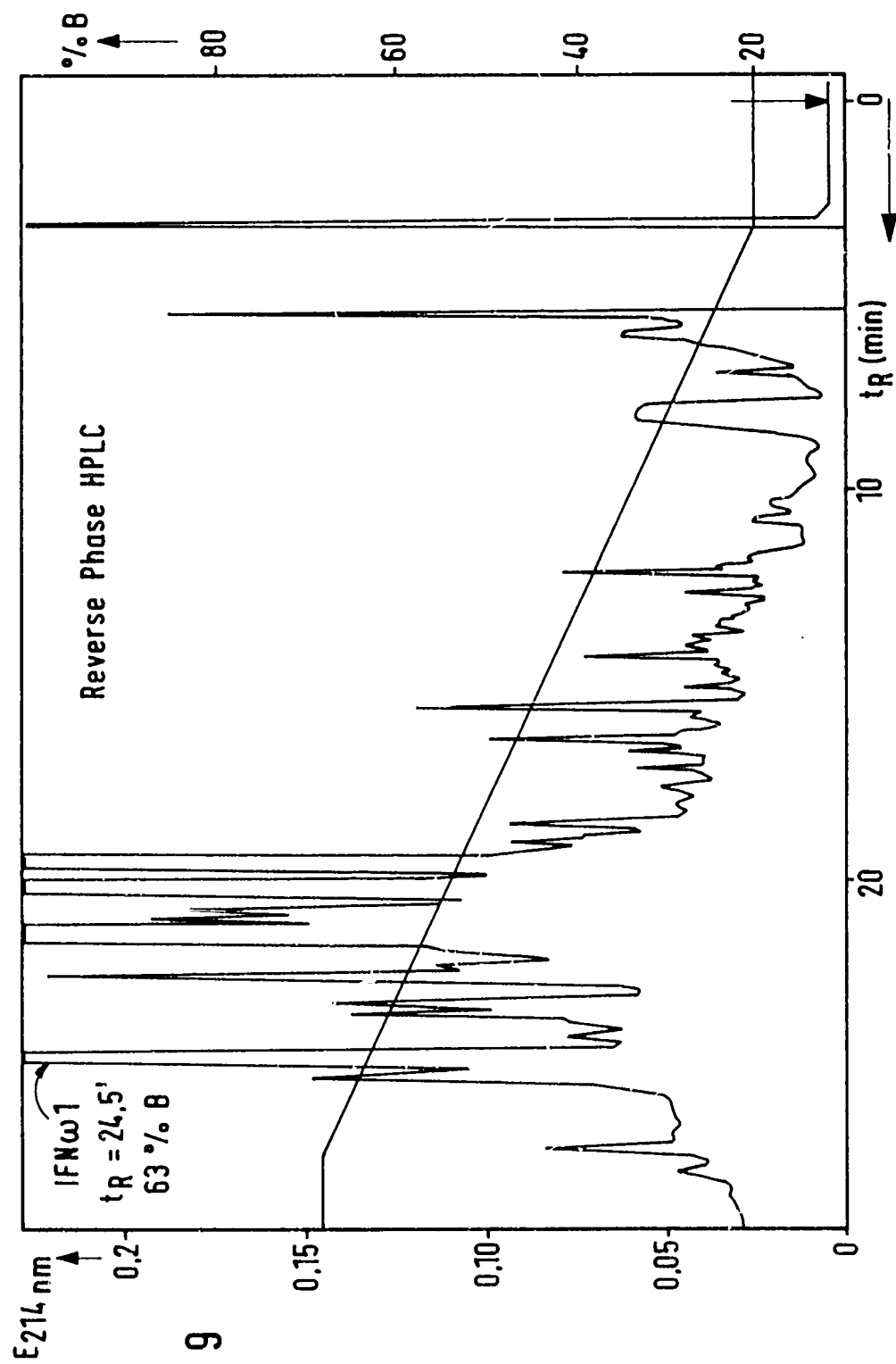


Fig. 9