

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

274 401

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁵
C 07 K 15/26
C 12 N 15/20

(21) PV 1609-83.C
(22) Přihlášeno 08 03 83
(30) Právo přednosti od 08 03 82
US (355, 298)

(40) Zveřejněno 12 09 90

(45) Vydáno 30 10 92

(72) Autor vynálezu

CAPON DANIEL JEFFREY, SAN FRANCISCO,
GOEDDEL DAVID VAN NORMAN, HILLSBOROUGH,
CALIFORNIA (US)

(73) Majitel patentu

GENENTECH, INC., SOUTH SAN FRANCISCO,
CALIFORNIA (US)

(54)

Způsob výroby polypeptidu se sekvencí
aminokyselin zvířecího interferonu

(57) Způsob výroby polypeptidu se sekvencí
aminokyselin zvířecího interferonu spočívá
podle vynálezu v tom, že se kultivuje mikro-
organismus typu E.coli nebo kvasínek nebo
buněčná kultura typu CHO buněčná linie. Mi-
kroorganismus nebo buněčná linie jsou trans-
formovány replikabilním vektorem schopným
exprese DNA sekvence kódující uvedený poly-
peptid. Vzniklý polypeptid se izoluje. Izo-
lovaný polypeptid lze použít jako prostře-
dek při léčení virových, maligních, imuno-
supresivních nebo imunodeficitních stavů
zvířat.

Tento vynález se obecně týká oblasti technologie rekombinantní DNA, prostředků a způsobů využívajících takovou technologii při objevu rozsáhlé třídy zvířecích interferonů, jejich výroby, různých produktů takové výroby a jejich použití.

Detailněji se tento vynález týká izolace a identifikace DNA sekvencí kódujících zvířecí interferony a konstrukce expresních vektorů rekombinantní DNA obsahujících DNA sekvence funkčně navázané na promotorové sekvence uskutečňující expresi a takto konstruovaných expresních vektorů. Z jiného pohledu se tento vynález týká hostitelských kultivačních systémů, jako jsou různé mikroorganismy a buněčné kultury obratlovců transformované takovými expresními vektory a řídící tak expresi shora uvedených DNA sekvencí. Z jiného pohledu se tento vynález týká prostředků a způsobů převedení nových konečných produktů takové exprese například farmaceutické prostředky, které jsou užitečné při profylaktickém a terapeutickém léčení zvířat. Vedle toho se tento vynález týká různých postupů užitečných při výrobě shora uvedených DNA sekvencí, expresních vektorů, hostitelských kultivačních systémů, konečných produktů a jejich součástí a jejich uspořádání.

Tento vynález vznikl na základě objevu DNA sekvencí a odvozených aminokyselinových sekvencí kódujících řadu hovězích alfa interferonů včetně jejich 3'- a 5'- sousedících sekvencí, což usnadňuje jejich in vitro navázání do expresních vektorů. Tyto objevy dále umožnily vývoj prostředků a způsobů produkce dostatečných množství zvířecích interferonů technologií rekombinantní DNA. To pak dále umožnilo stanovit jejich biochemické vlastnosti a jejich biologickou účinnost, takže je možná jejich efektivní produkce pro komerční/biologické použití.

A. Zvířecí interferony

Interferonové složky byly izolovány z tkání různých fylogenetických druhů nižších než člověk. Studie účinnosti těchto interferonů ukázaly, že tyto interferony vykazují různě stupně protivirových účinků v příslušném hostitelském zvířeti. Bylo také ukázáno, že účinek těchto interferonů není vždycky specifický. Například přípravky hovězích interferonů izolovaných z tkání měly antivirovou účinnost na opičí a lidské buňky. Podobně bylo nalezeno, že lidské interferony jsou účinné na různé buňky fylogeneticky nižších druhů.

Tato druhová interaktivita je nepochybně důsledek vysokého stupně homologního zachování interferonů jak pokud jde o složení tak i o sekvenování aminokyselin. Až dosud však toto vysvětlení zůstávalo teoretické, protože množství a čistota zvířecích interferonů, které bylo možno získat, byly nedostatečné pro to, aby bylo možno provést jednoznačné pokusy jejich charakterizace a pokusy týkající se biologických vlastností vyčištěných složek a také jejich srovnání s některými z jejich lidských protějšků.

Navzdory těmto nízkým množstvím a nízkým čistotám byla nalezena příčinná spojitost mezi interferonem a protivirovou účinností u příslušného hostitelského zvířete. Byla tedy žádoucí výroba zvířecích interferonů ve vysokých výtěžcích a čistotách, aby bylo možno začít a úspěšně provádět pokusné biotesty na zvířatech, které by vedly ke komerčnímu využití při léčení zvířat na virové infekce a na maligní, imunosupresivní a imunodepresivní stavy. Navíc by pak produkce izolovaných zvířecích interferonů umožnila jejich fyzikální i biologickou charakterizaci. Tím by byl položen základ kategorizace a následných srovnávacích studií s lidskými protějšky interferonových částic.

Studie, které byly až dosud se zvířecími interferony podle tohoto vynálezu dělány, jsou omezeny na použití spíše surových preparátů vzhledem k jejich malé dostupnosti, nicméně ukazují na jejich velmi důležité biologické funkce. Třída zvířecích interferonů nemá jenom terapeutickou protivirovou účinnost, ale jsou účinné jako profylaktický přídatek při léčení vakcínami a/nebo antibiotiky. Jak po klinické, tak komerční stránce jsou tedy velmi slibné.

Vypadá, že by aplikace technologie rekombinantní DNA mohla být nejúčinnější cestou získávání patřičně velkých množství zvířecích interferonů, potřebných pro to, aby mohlo dojít k jejich klinickému a obchodnímu využívání. Ať budou či nebudou takto vyrobené materiály zahrnovat glykosylaci, která je považována za charakteristickou pro přírodní materiál, budou pravděpodobně vykazovat bioaktivitu připouštějící jejich klinické použití při léčení virových, neoplastických a imunosupresivních stavů nebo nemocí zvířat.

B. Technologie rekombinantní DNA

Technologie rekombinantní DNA dosáhla v poslední době jistého stupně vývoje. Molekulární biologové jsou schopni poměrně snadno rekombinovat různé DNA sekvence. Vytváří se tak nové DNA entity schopné produkovat hojná množství exogenních proteinových produktů v transformovaných mikrobech. Existují obecné prostředky a způsoby pro in vitro ligaci různých fragmentů DNA (které mohou být zarovnány nebo jedno vlákno může přecházet). Získávají se tak potenciální expresní vektory užitečné pro transformaci konkrétních organismů. Tím se ovlivní syntéza žádaných exogenních produktů takovými organismy. Na základě individuálního produktu zůstává však tato cesta značně nedokončená. Věda ještě nedosáhla stupně, ve kterém by bylo možno pravidelně předpovídat, že lze dosáhnout úspěch. Ti, kteří dosáhli úspěšných výsledků, dosáhli toho bez patřičných experimentálních základů a se značným rizikem.

Plasmid, extrachromosomální smyčka dvouvláknové DNA nalezené v bakteriích a dalších mikrobech, často se vyskytující v buňce v mnoha kopiích, zůstává základním elementem technologie rekombinantní DNA. Informace, které jsou zakódovány v plasmidové DNA, jsou ty informace, které jsou potřebné pro reprodukci plasmidu v dceřinných buňkách (tj. počátek replikace) a dále obvykle takové informace, jako jedna nebo více fenotypických selekčních charakteristik jako je například v případě bakterií resistance na antibiotika. Získají se tak klony hostitelské buňky, která obsahuje příslušný plasmid. Ty se pak preferenčně kultivují v selektivním médiu. Využití plasmidů spočívá na skutečnosti, že mohou být štěpeny tou či onou restrikční endonukleasou nebo "restrikčním enzymem", při čemž příslušné restrikční endonukleasy nebo restrikční enzymy rozeznávají různá místa na plasmidové DNA. Tímto způsobem je možné vložit heterologní geny nebo fragmenty genů do plasmidu tak, že se napojí do rozštěpeného místa na rekonstruované konce přiléhající k místu rozštěpení. Vytvoří se tak zvané replikační expresní vektory. K rekombinaci DNA dochází vně buněk. Výsledný "rekombinantní" replikační expresní vektor nebo plasmid však může být vložen do buněk postupem, který je znám jako transformace. Kultivací transformantu se pak získávají velká množství rekombinantních vektorů. Navíc, jestliže je patřičně vložen gen do těch částí plasmidu, které ovládají transkripci a translaci kódované v informační DNA, lze výsledný expresní vektor použít ke skutečné výrobě polypeptidové sekvence, která je kódována vloženým genem. Tento proces se nazývá exprese.

Exprese začíná v oblasti, která je známa jako promotor. Ten je rozeznáván a vázán RNA polymerasou. V transkripční fázi exprese se DNA rozvine; funguje jako templát při iniciační syntéze informační RNA (mRNA) z DNA sekvence. Informační RNA se pak translací převede na polypeptid, který má takovou aminokyselinovou sekvenci, která je zakódovaná v mRNA. Každá aminokyselina je zakódovaná nukletidovým tripletem "kodonem". Ty pak souhrnně představují "strukturní gen", tj. část, která kóduje aminokyselinovou sekvenci polypeptidového produktu, který expresí vzniká. Translace začíná v místě "startovního" signálu (obvykle ATG, který se ve výsledné informační RNA stává AUG). Tak zvané stop-kodony definují konec translace a tím výrobu další aminokyselinové jednotky. Tento výsledný produkt může být získán rozkladem (jestliže je to nutné) hostitelské buňky v mikrobiálních systémech a izolací produktu od ostatních proteinů příslušnými čistícími postupy.

Při praktickém využití technologie rekombinantní DNA může dojít k expresi úplně heterologního polypeptidu (tak zvaná přímá exprese) nebo k expresi heterologního polypeptidu, který je napojen na část aminokyselinové sekvence homologního polypeptidu. V druhém případě

je někdy předpokládáný bioaktivní produkt bioneaktivní, dokud se v extracelulárním prostředí neodštěpí napojený homologní /heterologní polypeptid.

C. Technologie kultivace buněk

Kultivace buněk nebo tkání pro studium genetiky a buněčné fyziologie je odborníkům dobře známa. Existují prostředky a způsoby pro uchovávání permanentních buněčných linií připravených úspěšnými seriálovými transfery z izolovaných normálních buněk. Pro použití ve výzkumu se takové buněčné linie uchovávají na pevném podkladu v kapalném médiu nebo kultivací v suspenzi s obsahem živin. Práci ve velkém měřítku vadí nyní pouze mechanické problémy.

Tento vynález je založen na objevu, že technologie rekombinantní DNA lze použít k úspěšné výrobě zvířecích interferonů s výhodou přímo a v dostatečných množstvích pro to, aby bylo možné provádět klinické testy, které jsou potřebnou nutností předcházející jejich obchodní schválení. Produkt je ve všech svých formách vhodný pro profylaktické nebo terapeutické léčení zvířat, zvláště virových infekcí a maligních, imunosupresivních nebo imunodeficitních stavů. Formami produktu jsou různé oligomerní formy, které mohou zahrnovat glykosylaci, a také alelické variace jednotlivých členů nebo skupin. Tyto produkty jsou vyráběny systémy mikroorganismů nebo buněčných kultur, které jsou řízeny metodami genetického inženýrství. Existují tedy nyní možnosti izolovat a vyřábět zvířecí interferony účinněji než to kdy bylo možné. Jedním významným faktorem tohoto vynálezu, podle jeho nejvhodnějšího uspořádání, je schopnost geneticky řídit mikroorganismus nebo buněčnou strukturu tak, aby produkovala reprezentativní zvířecí interferon, hovězí interferon, v isolovatelných množstvích produkovaných hostitelskými buňkami v maturační formě.

Tento vynález zahrnuje takto vyráběné zvířecí interferony a prostředky a způsoby jejich výroby. Tento vynález se týká také expresních vektorů replikativní DNA nesoucích genové sekvence, které kódují zvířecí interferony ve formě schopné exprese. Dále se pak tento vynález týká kmenů mikroorganismů nebo buněčných kultur, které jsou transformovány shora popsanými expresními vektory, a fermentačních médií obsahujících takovéto transformované kmeny nebo kultury schopné produkovat zvířecí interferony.

Podle dalšího aspektu se tento vynález týká různých procesů použitelných pro přípravu shora uvedených interferonových genových sekvencí, DNA expresních vektorů, kmenů mikroorganismů, kultur buněk a jejich specifických uspořádání. Tento vynález se týká také přípravy fermentačních médií shora uvedených mikroorganismů a buněčných kultur. V jistých hostitelských systémech mohou být odvozeny takové vektory, aby produkovaly žádaný zvířecí interferon, který je z hostitelské buňky sekretován v maturační formě. Interferon, který obsahuje signální sekvenci odvozenou od 5'-sousedící oblasti příslušného genu, se zdá být transportován do buněčné stěny hostitelského organismu, kde se signální část během sekrece maturačního interferonového produktu odštěpí. Toto uspořádání umožňuje izolaci a čištění žádaného maturačního interferonu bez potřeby postupů, které eliminují znečištěniny intracelulárního hostitelského proteinu nebo zbytku buňky.

Navíc se tento vynález specificky týká výroby hovězího interferonu, který zde reprezentuje skupinu zvířecích interferonů produkovaných přímou expresí v maturační formě.

Pojem exprese "maturačního zvířecího interferonu" znamená produkci zvířecího interferonu buď mikrobiálně nebo buněčnou kulturou. Tento zvířecí interferon není doprovázen signálním peptidem nebo peptidovou sekvencí, která bezprostředně doprovází translaci zvířecí interferonové mRNA. Podle tohoto vynálezu se tedy získává maturační zvířecí interferon, který má jako první aminokyselinu methionin (díky inserci ATG iniciačního signálního kodonu do čela strukturního genu) nebo je methionin, jako první aminokyselina, intracelulárně nebo extracelulárně štěpen. Maturační zvířecí interferon může být podle tohoto vynálezu produkován také spolu s konjugovaným proteinem jiným než konvenčním signálním polypeptidem. Konjugát je specificky štěpen v intracelulárním nebo v extracelulárním prostředí.

A konečně, maturační zvířecí interferon může být produkován přímou expresí bez nutnosti odštěpení nějakého vnějšího nadbytečného polypeptidu. To je zvláště důležité tehdy, když daný hostitel neodstraní nebo neúčinně odstraní signální peptid, v němž je expresní vektor pro expresi maturačního interferonu spolu se signálním peptidem. Takto vyrobený matečný interferon se izoluje a vyčistí tak, aby byl vhodný pro léčení virových, maligních, imunosupresivních nebo imunodeficitních stavů.

Zvířecí interferony podle tohoto vynálezu jsou interferony, které jsou endogenní pro zvířecí organismy. Patří sem (podle nomenklatury analogické lidským interferonům) zvířecí alfa (leukocytový), beta (fibroblastový) a gama (imunní) interferony. Všechny tři řady byly ve zvířecích modelech identifikovány. Podle příkladu hovězího interferonu se zvířecí alfa řada skládá ze skupiny proteinů jako u člověka. Tyto interferony jsou méně homologické s odpovídajícími lidskými alfa interferony než kterékoliv z těchto zvířecích interferonů mezi sebou nebo kterékoliv z lidských alfa interferonů mezi sebou. Hovězí beta řada se skládá ze skupiny proteinů, které se od lidských liší. Podle tohoto vynálezu se získávají částice a skupinové hybridní interferony využitím výhody obvyklých restričních míst v genech různých zvířecích interferonů a rekombinací odpovídajících částí známými způsoby.

Zvířecí interferony podle tohoto vynálezu jsou interferony, které jsou normálně endogenní pro následující skupiny zvířat: ptáci, psi, skot, koně, kočky, kozy, ovce, ryby a prasata. Zvláště se podle tohoto vynálezu získávají interferony sudokopytníků, jako jsou telata, ovce a kozy. Interferony podle tohoto vynálezu se používají jako protivirová a protinádorová činidla v příslušném hostitelském zvířeti. Například hovězí interferony by mohly mít praktické uplatnění při léčení dýchacích cest telat a to buď ve spojení s (o sobě známými) antibiotiky jako terapeutickou složkou nebo s vakcínami jako profylaktickou složkou. Použití pro třídy, jak je shora popsáno, by bylo možno rozšířit na další skot, na kozy, ovce, prasata, koně, psy, kočky, ptáky a ryby. U koňů, psů, koček a ptáků lze očekávat, že protinádorový účinek odpovídajících interferonů by byl komerčně zvláště důležitý.

Následujícího principu, který je popsán vzhledem k hovězímu interferonu jako reprezentantu třídy, lze použít při získávání zvířecích interferonů podle tohoto vynálezu.

1. Hovězí tkáň, například tkáň hovězí slinivky břišní, byla převedena na mrazový prášek; ten byl zpracován tak, aby se po rozštěpení RNA a proteinových materiálů získala po vysrážení hovězí DNA (o vysoké molekulové hmotnosti).

2. DNA o vysoké molekulové hmotnosti se částečně nahodile rozštěpí vzhledem k umístění genů.

3. Výsledné DNA fragmenty se frakcionují podle velikosti. Získají se tak fragmenty, které obsahují od 15 000 do 20 000 bp (= párů bází, lépe párů nukleotidů).

4. Výsledné fragmenty ze stupně 3 se klonují s použitím λ Charon 30 fágového vektoru.

5. Takto připravené vektory se in vitro vbalí do infekčních fágových částic obsahujících rDNA. Získá se tak fágová banka. Ta se rozmnožením bakteriálních buněk zvýší na asi 10^6 násobek. Fág se vysévá do konfluente na trávník bakterií. Hybridizace se testuje sondou radioaktivního lidského interferonu.

6. Z příslušných klonů se izoluje odpovídající DNA, sestaví se její restriční mapa a analyzuje se Southernhybridizací. Restriční fragmenty, které obsahují geny hovězího interferonu, se subklonují na plasmidové vektory. Pak se sekvenují.

7. Sekvenovaná DNA se pak upraví pro in vitro vložení (inserci) do příslušného expresního vektoru, který se použije pro transformaci příslušné hostitelské buňky. Ta se pak nechá růst v kultivačním médiu, při čemž dochází k expresi žádaného produktu - hovězího interferonu.

8. Takto vyrobený hovězí interferon obsahuje ve zralé (maturační formě) 166 aminokyselin a 23 aminokyselin v presekvenzi. Má velice hydrofóbní charakter. Jeho molekulová hmotnost byla vypočtena na asi 21 409. Má podobné charakteristiky jako lidské leukocytové interferony. Bylo zjištěno, že je asi z 60 % homologní vzhledem k lidskému leukocytovému interferonu.

Podstata způsobu výroby polypeptidu se sekvencí aminokyselin zvířecího interferonu spočívá tedy podle vynálezu v tom, že se kultivuje mikroorganismus typu *E.coli* nebo kvasinek nebo buněčná kultura typu CHO buněčná linie. Mikroorganismus nebo buněčná linie jsou transformovány replikabilním vektorem schopným exprese DNA sekvence kódující uvedený polypeptid. Vznilý polypeptid se pak izoluje.

Popis výhodných uspořádání. A. Mikroorganismy/buněčné kultury

1. Bakteriální kmeny/promotory

Tato práce používá mimo jiné mikroorganismus *E.coli* K-12 kmen 294 (konec A, thi^- , hsr^- , $\text{k}^{\text{hsm}+}$) (25). Tento kmen je uložen v americké sbírce typů kultur - American Type Culture Collection, ATCC č. 31 446. Jsou však použitelné i různé jiné mikrobiální kmeny včetně známých kmenů *E.coli*, jako je například *E.coli* B, *E.coli* X 1776 (ATCC č. 31 537), *E.coli* W 3110 (F^- , λ^- , prototrofní) (ATCC č. 27 325), *E.coli* DP 50 SuPF (ATCC č. 39 061, uloženo 5. března 1982), *E.coli* JM83 (ATCC č. 39 062, uloženo 5. března 1982) nebo jiný mikrobiální systém. Mnohé z nich jsou uloženy a (potenciálně) jsou dostupné z uznávaných institucí skladujících mikroorganismy, jako je například American Type Culture Collection (ATCC) - viz katalogový seznam ATCC. Mezi tyto další mikroorganismy patří například *Bacilli*, jako je například *Bacillus subtilis* a jiné enterobakterie. Z nich lze uvést například *Salmonella typhimurium* a *Serratia marcesans*, které využívají plasmidy, které mohou poskytovat replikaci a expresi heterologních genových sekvencí.

Jako příklady výhodného použití pro započetí a udržení mikrobiální produkce heterologních polypeptidů lze uvést beta laktamasový a laktosový promotorový systém. Nedávno byl vyvinut systém založený na tryptofanovém operonu, tak zvaný *trp* promotorový systém. Podrobnosti týkající se vytvoření a konstrukce tohoto systému byly publikovány Goeddelem a spol. a Kleidem a spol. Bylo publikováno objevení a využívání četných dalších mikrobiálních promotorů a podrobnosti týkající se jejich nukleotidových sekvencí. To umožňuje zručným pracovníkům funkčně je ligovat s plasmidovými vektory.

2. Kvasinkové kmeny/kvasinkové promotory

Pro expresní systém podle tohoto vynálezu lze využít také plasmid YRp7, který je schopen selekce a replikace jak v *E.coli* tak v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*. Pro selekci v kvasinkách obsahuje plasmid *IRP1* gen (gen pro tryptofan - 1), který komplementuje (dovoluje růst za nepřítomnosti tryptofanu) kvasinky obsahující mutace v tomto genu, které byly nalezeny na chromosomu IV kvasinek. Jedním z použitelných kmenů je kmen RH218, uložený v American Type Culture Collection (ATCC č. 44 076). Tomu je však nutno rozumět tak, že jakýkoliv kmen *Saccharomyces cerevisiae*, který obsahuje mutaci, která poskytuje konečný *trp1*, by mohl být účinným prostředím pro expresi plasmidu obsahujícího expresní systém. Příkladem dalšího kmene, který může být použit, je *pep4-1*. Tento tryptofanový auxotrofní kmen má také mutaci v *IRP1* genu.

Jestliže se na 5'-stranu nekvasinkového genu umístí 5'-sousedící DNA sekvence (promotor) z kvasinkového genu (pro alkohol-dehydrogenasu 1), pak může podporovat expresi cizího genu v kvasinkách (po umístění do plasmidu, který je použit k transformaci kvasinek). Kromě toho promotor příslušné exprese nekvasinkovým genem v kvasinkách vyžaduje, aby druhá kvasinková sekvence byla umístěna na 3'-konci nekvasinkového genu na plasmidu. To dovoluje příslušnou polyadenylaci a terminaci transkripce v kvasinkách. Tento promotor stejně jako jiné se s výhodou mohou použít v tomto vynálezu - viz výše. Ve výhodném uspořádání se 5'-sousedící sekvence kvasnicového PGK (3-fosfoglycerát kinasa) genu umístí proti strukturálnímu

genu následována opět DNA, která obsahuje terminační - polyadenylační signály, například IRP1 gen nebo PGK gen.

Protože kvasinková 5'-sousedící sekvence (spolu s 3'-kvasinkovou terminační DNA) (viz výše) může podporovat expresi cizích genů v kvasinkách, zdá se pravděpodobné, že by 5'-sousedící sekvence kteréhokoliv kvasinkového genu s vysokou expresí mohla být použita pro expresi důležitých genových produktů. Jelikož za některých okolností dochází k expresi až 65 % jejich rozpustného proteinu jako glykolytické enzymy a jelikož tato vysoká hladina se zdá být důsledkem produkce vysokých hladin individuálních mRNA kyselin, bylo by možné pro účely exprese použít 5'-sousedící sekvence kteréhokoliv jiného glykolytického genu - např. enolasy, glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasy, hexokinasy, pyruvát-dekarboxylázy, fosfofruktokinasy, glukoso-6-fosfát-isomerasy, 3-fosfoglycerát-mutasy, pyruvát-kinasy, triosofosfát-isomerasy, fosfoglukoisomerasy a glukokinasy. Pro příslušnou terminaci a mRNA polyadenylaci v takovém expresním systému lze použít kterékoliv 3'-sousedící sekvence těchto genů - viz níže. Některé jiné geny, které vykazují vysokou expresi, jsou geny pro produkci kyselých fosfatů a dále ty geny, které vykazují vysoké hladiny produktů exprese díky mutaci v 5'-sousedících oblastech (mutanty, které zvyšují expresi) - obvykle díky přítomnosti TY1 transportovatelného prvku.

Všechny shora uvedené geny jsou transkribovány kvasinkovou RNA polymerasou II. Je možné, že promotory RNA polymerasy I a III, které transkribují geny pro ribosomální RNA, 5S RNA a tRNA kyseliny mohou být při takových expresních konstrukcích také užitečné.

Konečně, mnoho kvasinkových promotorů obsahuje také kontrolu transkripce, takže mohou být vypnuty nebo zapnuty změnou podmínek kultivace. Některými příklady takových kvasinkových promotorů jsou geny, které produkují následující proteiny: alkohol-dehydrogenasa II, isocytochrom-c, kyselinová fosfatasa, degradativní enzymy spojené s metabolismem dusíku, glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenasa a enzymy, které jsou zodpovědné za využití meltosy a galaktosy. Taková kontrolní oblast by byla velice užitečná při řízení exprese proteinového produktu - zvláště tehdy, je-li produkt pro kvasinky toxický. Také by bylo možné vložit kontrolní oblast jedné 5'-sousedící sekvence s 5'-sousedící sekvencí, která obsahuje promotor z genu, který vyazuje vysokou expresi. Výsledkem by byl hybridní promotor. To by bylo možné, protože kontrolní oblast a promotor jsou zřejmě fyzikálně rozdílné DNA sekvence.

3. Systémy buněčných kultur/vektory buněčných kultur

V posledních letech se množení buněk obratlovců stalo rutinní záležitostí. Jako hostitel pro produkci zvířecích interferonů se mohou použít COS-7 linie fibroblastů ledvin opic. Experimenty, které jsou zde podrobně popsány, se však mohou provádět v kterékoliv buněčné linii, která je schopna replikace a exprese slučitelného (kompatibilního) vektoru, např. WI38, BHK, 3T3, CHO, VERO a HeLa buněčné linie. Pro expresní vektor je dále potřeba, aby počátek replikace a promotor byly umístěny do čela genu (u kterého má dojít k expresi) spolu s nutnými ribosomálními vazebnými místy, RNA splicing místy, polyadenylačním místem a terminačními sekvencemi transkripce. Ačkoliv zde budou používány tyto podstatné prvky SV40, je tomu nutno rozumět tak, že i když je zde tento vynález popsán v termínech výhodného uspořádání, není toto výhodné uspořádání konstruováno tak, aby bylo omezeno na uvedené sekvence. Například lze použít počátků replikace jiných virových vektorů (např. Polyoma, Adeno, VSV, BPV atd.) a rovněž buněčných počátků DNA replikace, které mohou fungovat v neintegrováném stavu.

B. Vektorové systémy. 1. Přímá exprese maturačního hovězího interferonu v E.coli

Postup, který se používá pro získání přímé exprese hovězího interferonu v E.coli jako maturačního interferonového polypeptidu (minus signální sekvence), zahrnuje kombinaci plasmidu, který obsahuje promotorový fragment a iniciační signál translace, s upraveným fragmentem zvířecí genomové DNA obsahující kódovací oblast pro maturační interferon.

2. Exprese v kvasinkách

Pro to, aby došlo k expresi genu, jako je DNA zvířecího interferonu, v kvasinkách, je nutné zkonstruovat plasmidový vektor, který obsahuje čtyři složky. První složkou je část, která umožňuje transformaci jak *E.coli* tak kvasinkami. Tato část musí tedy obsahovat selektovatelný gen z každého organismu, jako je například gen ampicilinové resistance z *E.coli* a gen *TRP1* z kvasinek. Je také potřeba, aby tato složka udržovala počátek replikace z obou organismů jako plasmidovou DNA v obou organismech, jako je například *E.coli* počátek z pBR322 a *arsI* počátek z chromosomu III kvasinek.

Druhou složkou plasmidu je 5'-sousedící sekvence z kvasinkového genu, vykazujícího vysokou expresi, která uvádí transkripci dolního strukturního genu, jako je například 5'-sousedící sekvence z kvasnicového PGK (3'-fosfoglycerátkinasa) genu.

Třetí složkou tohoto systému je strukturní gen, který je konstruován tak, že obsahuje jak ATG iniciační tak i končící (terminační) signály translace. Isolace a konstrukce takového genu je zde popsána výše.

Čtvrtou složkou je kvasnicová DNA sekvence obsahující 3'-sousedící sekvenci z kvasnicového genu, která obsahuje příslušné signály pro terminaci transkripce a pro adenylaci.

3. Exprese kulturou savčích buněk

Strategie syntézy imunního interferonu kulturou savčích buněk je založena na vývoji vektoru, který je schopen jak autonomní replikace tak exprese cizího genu za kontroly heterologní transkripční jednotkou. Replikace tohoto vektoru tkáňovou kulturou lze dosáhnout tak, že se získá počátek replikace DNA a dále pomocná funkce (T antigen) zavedením vektoru do buněčné linie, u které dochází k endogenní expresi tohoto antigenu. Promotor viru SV40 předchází strukturní gen interferonu a zajišťuje transkripci genu.

Užitečný vektor pro získání exprese sestává z pBR322 sekvence. Představuje selektovatelný marker pro selekci v *E.coli* (ampicilinová resistance) a také *E.coli* počátek DNA replikace. Tyto sekvence jsou odvozeny od plasmidu pML-1 a zahrnují oblast EcoRI a BamHI restričních míst. SV40 počátek je odvozen od 342 bp PvuII - HindIII fragmentu zahrnující tuto oblast (oba konce jsou převedeny na EcoRI konce). Tyto sekvence vedle toho, že obsahují virový počátek DNA replikace, kódují promotor jak pro dřívější tak pro pozdější transkripční jednotku. Orientace oblasti SV40 počátku je taková, že promotor pozdější transkripční jednotky je uložen v sousedství genu kódujícího interferon.

Vynález je ilustrován připojenými výkresy, na nichž:

obr. 1 ukazuje jižní (Southern) hybridizaci a) lidské, b) hovězí a c) vepřové genomové DNA štěpené EcoRI a hybridizované při různých koncentracích formamidu 570 bp EcoRI fragmentem (značený ^{32}P) obsahujícím kódovací oblast A/D hybridu lidského leukocytového interferonu. Hybridizací ve 20 procentním formamidu se získá nejjasnější vzorek multigenu skupiny hovězích a vepřových leukocytových interferonů.

Obr. 2 ukazuje jižní (Southern) hybridizaci čtyř různých fágových rekombinantů hovězí genomové DNA štěpených EcoRI, BamHI a HindIII a hybridizovaných sondou ^{32}P -značeného lidského leukocytového genu. Klon 83 poskytuje dva hybridizační fragmenty, každý s restričním enzymem.

Obr. 3a ukazuje část nukleotidové sekvence z plasmidového subklonu p83BamHI1,9 kb a odvozenou aminokyselinovou sekvenci tam zakódovaného hovězího leukocytového interferonu. Signálním peptidem je aminokyselinový zbytek od S1 až k S23.

Obr. 3b ukazuje nukleotidovou sekvenci a odvozenou aminokyselinovou sekvenci druhého hovězího leukocytového interferonu ($\alpha 2$) plasmidového subklonu p67EcoRI3,2 kb.

Obr. 3c ukazuje kompletní maturační nukleotidovou sekvenci a odvozenou aminokyselinovou sekvenci třetího hovězího leukocytového interferonu ($\alpha 3$) z plasmidového subklonu p35EcoRI-BamHI3,5 kb.

Obr. 3d ukazuje nukleotidovou sekvenci a odvozenou aminokyselinovou sekvenci čtvrtého hovězího leukocytového interferonu z plasmidového subklonu p83EcoRI-BamHI2,9 kb. Signálem je aminokyselinový zbytek S1 až S23. Maturační protein sestává ze 172 aminokyselinových zbytků. Je třeba poznamenat, že poslední prodloužení šesti aminokyselinových zbytků se připisuje změně nukleotidové báze v poloze 511. To umožňuje 6 dalších translačních kodonů před terminačním signálem.

Obr. 4a, 4b a 4c srovnávají aminokyselinové sekvence BoIFN- α 1, α 2, α 3 a α 4 se sekvencemi 11 známých lidských interferonů. Jsou také uvedeny aminokyseliny, které jsou zachovány u všech lidských leukocytových interferonů, u všech hovězích leukocytových interferonů a polohy u většiny lidských leukocytových interferonů vzhledem k hovězím α 1 a α 4.

Obr. 5 je schematický diagram konstrukce expresního plasmidu hovězího leukocytového interferonu pBoIFN- α 1trp55. Výchozími materiály jsou trp expresní vektor pdeltaR1src a BamHI fragment z plasmidového subklonu p83BamHI1,9 kb.

Obr. 6 ukazuje jižní (Southern) hybridizaci hovězí DNA štěpené buď účinkem EcoRI nebo HindIII, BamHI, BglII či PvuII s radioaktivní sondou odvozenou od BoIFN- α 1 nebo BoIFN- α 4 genových fragmentů. Každý IFN se preferenčně hybridizuje různými podskupinami BoIFN α genů.

Obr. 7 ukazuje restrikční mapu insertů genomových hovězích DNA ze tří fágových rekombinantů, které hybridizují lidský fibroblast sondou lidského interferonového genu. Umístění a orientace hovězího IFN- β je označeno černým obdélníkem. Restrikční místa, která jsou označena hvězdičkou, znamenají, že jde o částečnou informaci v restrikční mapě.

Obr. 8 ukazuje podrobnou restrikční mapu tří genů, které jsou uvedeny na obrázku 7; šrafovaná část znamená signální sekvenci, stínovaná (tečkovaná) část znamená maturační sekvenci.

Obr. 9a, 9b a 9c popisují nukleotid a odvozené aminokyselinové sekvence pro BoIFN- β 1, 2 a 3 geny.

Obr. 10 srovnává aminokyselinové sekvence tří BoIFN- β genů s lidským IFN- β .

Obr. 11 je jižní (Southern) blot z obr. 2 hybridizovaný sondou BoIFN- β 1 genu za podmínek, při nichž by byl obecně zřejmý pouze jeden hybridizační fragment, prováděl-li se analogické experimenty s lidskou genomovou DNA a lidským IFN- β genem.

Obr. 12 schematicky popisuje strategii, která byla použita pro expresi všech tří BoIFN- β genů za kontroly trp operonu z *E.coli*.

Obr. 13 uvádí srovnání odvozených aminokyselinových sekvencí BoIFN- γ , HuIFN- γ a myšího IFN- γ .

Následující podrobný popis ilustruje vynález pokud jde o přípravu různých zvířecích interferonů technologií rekombinantní DNA a uvádí obecně aplikovatelné způsoby přípravy zvláště hovězích leukocytových interferonů. Způsob přípravy je popsán na bakteriálním systému.

A. Isolace hovězí DNA

Pro účel konstrukce banky zvířecích genů se ze zvířecí tkáně modifikací postupu podle Blina a Stafforda izoluje DNA s vysokou molekulovou hmotností. Tato DNA je nahodile fragmentována pokud jde o umístění genu a je frakcionována podle velikosti, takže se získají fragmenty s 10 000 až 20 000 bázemi (nukleotidy) pro klonování na lambda fágový vektor.

Zmrazená tkáň, například hovězí slinivka břišní, se v kapalném dusíku rozele na jemný prášek. Pak se převádí do roztoku (solubilizace) obsahující 0,25M EDTA, 1% Sarkosyl a 0,1 mg/ml proteinasy K (25 ml/gram tkáně) tři hodiny při 50 °C. Ze získaného viskózního roztoku se odstraní proteiny třemi extrakcemi fenolem a jednou extrakcí chloroformem. Zbytek se dialysuje v 50mM Tris-HCl (pH = 8), 10mM EDTA a 10mM chloridu sodném a pak se dvě hodiny při 37 °C štěpí účinkem tepelně zpracované pankreatické ribonukleasy (0,1 mg/ml).

Po extrakci fenolem a etherem se DNA vysráží dvěma objemy ethanolu, promyje se 95% ethanol, lyofilizuje se a přes noc při 4 °C se znovu rozpustí v TE pufru (1mM Tris-HCl (pH = 7,5), 1mM EDTA) na konečnou koncentraci 1 až 2 mg/ml. Podle elektroforézy na 0,5% neutrálním agarovém gelu měla konečná DNA délku více než 100 kilobází (kb; kilonukleotidů).

B. Částečné endonukleasové štěpení hovězí DNA a frakcionace podle velikosti

0,1 mg hovězí DNA se při 37 °C 60 minut štěpí působením 1,25, 2,5, 5 a 10 jednotek Sau3A v reakci (1 ml), která obsahuje 10mM Tris-HCl (pH = 7,5), 10mM chlorid hořečnatý a 2mM dithiothreitol. Inkubace se zastaví přidáním EDTA na 25mM koncentraci. Následuje extrakce fenolem, extrakce etherem, přidání octanu sodného na 0,3M koncentraci (pH = 5,2) a vysrážení třemi objemy ethanolu. DNA se znovu rozpustí v TE pufru při 68 °C a sedimentuje se 10 až 40% lineárním sacharosovým gradientem v Beckmanově rotoru SW 27 při 27 000 otáčkách 22 hodin při 20 °C. Frakce (o objemu 0,5 ml) se analyzují na 0,5% gelu za použití Eco RI rozštěpené Charon 4A DNA jako standardu molekulové hmotnosti. Ty frakce, které obsahují 15 až 20 kb DNA fragmenty, se spojí, vysráží se ethanolem a znovu se rozpustí v TE pufru.

C. Konstrukce banky hovězí genomové DNA

Klonováním 15 až 20kb hovězí DNA se získá lambda Charon 30 A vektor s G-A-T-C nezarovnanými konci, které se získají odstraněním dvou vnitřních Bam HI fragmentů z fága. Charon 30 A se kultivuje v *E. coli* kmen DP 50 SupF (ATCC č. 39061, uloženo 5. března 1982) v médiu NZYDT, zkoncentruje se vysrážením s polyethylenglykolem a vyčistí se gradientovou centrifugací. Fágová DNA se připraví z vyčištěného fága dvojnásobnou extrakcí fenolem a pak jednou extrakcí fenolem a etherem. DNA se zkoncentruje vysrážením s ethanolem.

Pro přípravu koncových fragmentů Charonu 30A se 50 µg fágové DNA aneluje 2 hodiny při 42 °C v 0,25 ml 50mM Tris-HCl (pH 8), 10mM chloridu hořečnatém a 0,15M chloridu sodném, úplně se rozštěpí působením Bam HI, extrahuje se fenolem a etherem a sedimentuje se v 10 až 40% sacharosovém gradientu jak shora popsáno. Frakce, které obsahují 32 kb anelované části fága, se spojí a vysrážejí se ethanolem.

Vyčištěné Charon 30 A části (6 mikrogramů) se znovu anelují dvě hodiny při 42 °C, spojí se s 0,3 µg 15 až 20 kb hovězí DNA a 400 jednotkami polynukleotidové ligasy fága T4 a inkubují se přes noc při 12 °C v 0,07 ml reakční směsi, která obsahuje 50mM Tris-HCl (pH = 7,5), 10mM chlorid hořečnatý, 20mM dithiothreitol a 50 mikroorganismů/ml hovězího serumalbuminu. Ligovaná DNA se pak vbalí (pakázuje) do maturačních lambda fágových částic pomocí in vitro lambda vbalovacího systému.

Složky tohoto systému - sonikový extrakt (SE), mrazový lyzátní (FTL), protein A s pufr A a M1 - se připraví popsaným způsobem. Podíly ligované DNA směsi o objemu tři mikrolitry se inkubují s 15 mikrolitry pufru A, 2 µl pufru M1, 10 µl SE a 1 µl proteinu A 45 minut při 27 °C. Během 45 minut FTL v ledu roztaje, spojí se s 0,1 objemu pufru M1 a centrifuguje se při 35 000 otáčkách za minutu při 4 °C 25 minut. Ke shora uvedené reakční směsi se přidá 0,075 ml supernatantu. Po dalších dvou hodinách inkubace při 27 °C se malá část vbalovací reakce titruje na kmen DP 50 SupF - viz níže. Podle tohoto postupu se získá celkem asi $1,1 \cdot 10^6$ nezávislých hovězích DNA rekombinantů. Zbytek vbalovací směsi se rozmnoží "plate-lysate" metodou vyséváním rekombinantů na DP 50 SupF při hustotě 10 000 PFU (jednotek tvořících plak) na 15 cm NZYDT agarové desky.

D. Screening fágové banky genů hovězích interferonů

Strategie, která se používá k identifikaci fágových rekombinantů nesoucích geny hovězího interferonu spočívá v detekci homologie nukleotidů radioaktivními sondami připravenými z klonovaných genů lidských leukocytových, fibroblastových a imunních interferonů. Podmínky hybridizace jsou dány Southern bloty genomové zvířecí DNA. Pět mikrogramů každé z

vysokomolekulárních DNA (připravených jak shora uvedeno) z lidské placenty, hovězí slinivky břišní a vepřových submaxilárních žláz se úplně štěpí působením EcoRI, pak se elektroforezují na 0,5% agarovém gelu a přenesou se na nitrocelulosový papír. ^{32}P -značená DNA sonda se připraví z 570 bp EcoRI fragmentu obsahujícího protein s kódovací oblastí maturationálního leukocytového interferonu (A/D hybridu) na Bgl II restrikčním místě podle standardních postupů, které jsou uvedeny v odborné literatuře. Každý nitrocelulosový filtr se prehybridizuje při 42 °C přes noc v 5 x SSC (citran sodný ve fyziologickém roztoku), 50mM fosforečnanu sodném (pH = 6,5), 0,1 mg/ml sonikované lososové spermální DNA, 5 x Denhardtovým roztokem, 0,1% dodecylsulfátem sodným, 0,1% fosforečnanem sodným, který obsahuje buď 10, 20 nebo 30 % formamidu a pak se hybridizuje značenou sondou s $100 \cdot 10^6$ impulsy za minutu ve stejném roztoku s obsahem 10 % dextransulfátu sodného. Po inkubaci přes noc při 42 °C se filtry promyjí čtyřikrát ve 2 x SSC, 0,1% SDS (dodecylsulfát sodný) za teploty místnosti, jednou ve 2 x SSC a pak se přes noc exponují na rtg film Kodak XR-5 s kontrastním filtrem Dupont Cronex. Nejvyšší počet hybridizovaných vazeb byl detegován ve štěpech hovězí a vepřové DNA a to tehdy, když byla hybridizace prováděna s 20 % formamidu. Tento výsledek prokazuje multigennost genů leukocytových interferonů u krav a prasat analogicky jako to bylo dříve v literatuře popsáno u člověka. Stejně hybridizační podmínky byly použity při vyhledávání interferonových genů v bance hovězích DNA.

500 000 Fágových rekombinantů bylo vyseto na desku DP 50 SupF při hustotě 10 000 PFU/15 cm desky. Kopie každé desky na nitrocelulosový papír byly připraveny způsobem podle Bentona a Davise. Filtry byly hybridizovány lidskou LeIF genovou sondou jak shora popsáno. Bylo získáno devadesát šest hybridizovaných plaků, které při opakovaném screeningu dávaly silné signály.

V hovězí bance byly dále vyhledávány fibroblastové a imunní interferonové geny. Sondy byly dělány s 502 bp Xba I - Bgl III fragmentem, který obsahuje úplný maturační lidský fibroblastový interferonový gen, 318 bp Alu I fragment (obsahující aminokyseliny 12 až 116) a 190 bp Mbo II fragment (obsahující aminokyseliny 99 až 162) z maturační kódovací oblasti genu lidského imunního interferonu. Hybridizace $1,2 \cdot 10^6$ fágových rekombinantů poskytla celkem 26 hovězích fibroblastů a 10 klonů hovězího imunního interferonu.

E. Charakterizace fágových rekombinantů.

Fágová DNA byla připravena shora popsaným způsobem z 12 rekombinantů, které byly hybridizovány sondou lidského leukocytového interferonu. Každá DNA byla štěpena samostatně a v kombinaci s EcoRI, Bam HI a Hind III; produkt byl podroben elektroforese na 0,5% agarovém gelu. Hybridizační sekvence byly zmapovány Southern metodou. Srovnání samostatně rozštěpených DNA z klonů 10, 35, 78 a 83 je uvedeno na obrázku 2. U každého fága bylo zjištěno, že pozorované velikosti restrikčních fragmentů a odpovídající hybridizační matrice jsou rozdílné a nepřekrývají se. To znamená, že každý z těchto čtyř fágů nese gen jiného hovězího interferonu. Vedle toho bylo zjištěno, že štěpení klonu 83 každým ze třech výše uvedených enzymů poskytuje v každém případě dva diskrétní hybridizační pásy; to znamená, že tento rekombinant může nést dva blízko sebe napojené interferonové geny.

F. Subklonování genů hovězího leukocytového interferonu.

Restrikční fragmenty ze tří fágových rekombinantů, které jsou hybridizovány lidskou leukocytovou genovou sondou byly subklonovány v klonovacím místě multirestrikčního enzymu pBR322 derivátu, pUC9. Plasmid pUC9 byl odvozen od pBR322 tak, že se nejdříve odstraní 2067 bp EcoRI-PvuII fragment, který obsahuje tetracyklinový resistenční gen, pak se vloží 425 bp HaeII fragment a fága M13mp9 do HaeII místa výsledného plasmidu v poloze 2352 (vzhledem k pBR322 notaci). HaeII fragment z fága mp9 obsahuje N-terminální kódovací oblast E. coli lacZ genu, do níž bylo mezi 4. a 5. aminokyselinový zbytek β -galaktosidasy vloženo klonovací místo multirestrikčního enzymu o sekvenci CCA AGC TTG GCT GCA GGT CGA CGG ATC CCC GGG. Vložením (insercí) fragmentu cizí DNA do těchto klonovacích míst se přerušuje konti-

nuita mezi lac promotorem a lacZ genem. Dochází tak ke změně fenotypu JM83 transformovaného plasmidu z lac^+ na lac^- .

Shora uvedené fragmenty jsou: a) 1,9 kb Bam HI fragment a 3,7 kb EcoRI fragment z klonu 83 (který odpovídá nepřekrývajícím se segmentům téhož rekombinantu), b) 3,5 kb BamHI - EcoRI fragment z klonu 35 a c) 3,2 EcoRI fragment z klonu 67. Ve všech případech se 0,1 μ g příslušně štěpeného vektoru liguje s desetinasobným molárním nadbytkem vyčištěného fragmentu, transformuje se do E.coli kmen JM83 (ATCC č. 39 062, uloženo 5. března 1982) a vysévá se na M9 desky, které obsahují 0,04 mg/ml 5-brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktosidu a 0,2 mg/ml ampicilinu. Bílé kolonie, které domněle nesou DNA insert v restriční oblasti přerušující kódovací oblast lacZ genu v pUC9, byly přeneseny do 5 ml LB (kultivační prostředí) s 0,02 mg/ml ampicilinu, kultivovány několik hodin při 37 °C a pak testovány na vložený fragment minipreparačním postupem plasmidové DNA.

G. DNA sekvence genu hovězího leukocytového interferonu na klonu 83.

DNA sekvence od Bam HI místa plasmidu p83BamHI1,9 kb (1,9kb fragmentový subklon klonu 83) byla stanovena Maxam-Gilbertovým chemickým postupem, jak je známo z literatury. Tato sekvence je uvedena na obrázku 3. Nejdelší otevřená čtecí oblast kóduje polypeptid o 189 aminokyselinách s významnou homologií k lidským leukocytovým interferonům (obr. 4). Analogicky jako lidské proteiny, sestává hovězí leukocytový interferon z hydrofóbního signálního peptidu o 23 aminokyselinách, který předchází maturační protein o 166 aminokyselinách identickou sekvencí: ser - leu - gly - cys. Čtyři cysteinové zbytky v polohách 1, 29, 99 a 139 jsou u těchto částí přesně zachovány. Homologie hovězího a lidského interferonu je srovnávána v tabulce 1. Jak lze očekávat, hovězí protein je podstatně méně homologní (přibližně ze 60 %) s kterýmkoliv lidským proteinem na rozdíl od vzájemné homologie lidských proteinů mezi sebou (větší než 80 %).

DNA sekvence a odvozené aminokyselinové sekvence dalších třech genů hovězích leukocytových interferonů, které se vyskytují na plasmidových subklonech p67EcoRI3,2 kb, p35EcoRI-BamHI3,5 kb a p83EcoRI3,7 kb, jsou uvedeny na obr. 3b, 3c, respektive 3d.

Z tabulky 1 je vidět, že zatímco BoIFN- α 2 a BoIFN- α 3 geny kódují peptidy s pouze malými zřetelnými rozdíly vzhledem k BoIFN- α 1, BoIFN- α 4 se od kteréhokoliv jiného hovězího peptidu liší stejně jako se liší kterýkoliv hovězí leukocytový interferon od lidského leukocytového interferonu.

Abychom se ujistili, že α 4 gen je odvozen od stejně obsáhlé třídy buněčných proteinů jako jiné BoIFN- α -geny, byla genomová hovězí DNA štěpena několika restričními endonukleasami a hybridizována radioaktivními DNA fragmenty reprezentujícími kódovací oblasti proteinů α 1 (612 bp AvaII fragment) a α 4 (EcoRI-XmnI fragment pBoIFN- α 4trp15) genů v 50% formamidu, který nedovoluje vzájemnou hybridizaci dvou genů. Každý gen s výhodou hybridizuje jinou řadu fragmentů hovězí DNA. Tyto výsledky zřetelně demonstrují existenci dvou různých skupin hovězích leukocytových interferonů, kde α 1 a α 4 proteiny mohou být považovány za jejich reprezentanty.

T a b u l k a 1

Srovnání rozdílů kódovacích sekvencí hovězích a lidských interferonů α

	α 1	α 2	α 3	α 4	α A	α B	α C	α D	α F	α H	α I	α J	α K
BoIFN- α 1		94	92	54	61	62	63	64	61	64	63	61	65
BoIFN- α 2	96		91	53	61	61	64	63	62	63	63	64	64

T a b u l k a 1 - pokračování

	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 4$	αA	αB	αC	αD	αF	αH	αI	αJ	αK
BoIFN- $\alpha 3$	100	96		45									
BoIFN- $\alpha 4$	52	50	52		54	54	58	55	56	58	56	54	54
HuIFN- αA	56	52		39		81	81	83	82	83	81	80	86
HuIFN- αB	43	39		48	70		81	77	81	80	79	79	81
HuIFN- αC	61	57		52	70	65		81	89	86	94	92	83
HuIFN- αD	52	48		48	74	61	65		83	81	80	78	84
HuIFN- αF	61	57		52	70	65	100	65		83	89	86	83
HuIFN- αH	56	52		52	74	74	74	83	74		84	84	84
HuIFN- αI	61	57		52	70	65	100	65	100	74		91	81
HuIFN- αJ	56	52		48	61	57	91	70	91	65	91		80
HuIFN- αK	52	48		48	83	70	74	91	74	91	74	65	

Čísla znamenají procenta homologie.

Dolní levá polovina se týká presekvence o 23 aminokyselinách.

Horní pravá polovina se týká maturačního proteinu o 166 aminoaminokyselinách.

A, B, C atd. znamenají lidské leukocytové interferony A, B, C atd.

H. Přímá exprese maturačního BoIFN- $\alpha 1$ v *E.coli*.

Konstrukce přímého expresního plasmidu je souhrnně uvedena na obr. 5. Plasmidový subklon p83BamHI, 9 kb se úplně rozštěpí působením Ava II. 612 bp fragment obsahující gen hovězího leukocytového interferonu se izoluje elektroforesou na 6% polyakrylamidovém gelu a elektroelucí. Přibližně 1,5 μ g tohoto fragmentu se štěpí působením Fnu4H, extrahuje se fenolem a etherem a vysráží se ethanolem. Výsledné Fnu4H přečnívající konce se doplní na zarovnané konce šesti jednotkami DNA polymerasy I (Klenowův fragment) při 12 °C během 30 minut ve 20 mikrolitrech, které obsahují 20mM Tris-HCl (pH = 7,5), 10mM chloridu hořečnatém, 4mM dithiothreitolu a 0,1mM dATP, dGTP, dCTP i dTTP. Po extrakci fenolem a etherem se DNA štěpí působením PstI a pak se podrobí elektroforese na 6% gelu. Z gelu se elektroeluuje výsledný PstI fragment se zarovnanými konci obsahující 92 párů nukleotidů (bp), který začíná u prvního nukleotidu kódovací oblasti maturačního hovězího leukocytového interferonu.

Zbytek maturační kódovací oblasti se izoluje následujícím způsobem. Tři mikrogramy Bam HI insertu z p83BamHI 1,9 kb se částečně štěpí 14 jednotkami PstI 10 minut při 37 °C ve 45 mikrolitrové reakci, která obsahuje 10mM Tris-HCl (pH = 7,5), 10mM chlorid hořečnatý a 2mM dithiothreitol, mačež se extrahuje fenolem a etherem. Žádaný 1440 bp částečný PstI - BamHI fragment, počínající u nukleotidu 93 maturační kódovací oblasti, se izoluje na 6% polyakrylamidovém gelu.

Plasmid pdeltaRIsrC je derivát plasmidu pSRCex16, ve kterém se místo EcoRI vedle trp promotoru a vzdálené od src genu odstraní DNA polymerasou I a doplní se oligonukleotidem AATTATGAATTCAT (syntetizovaným fosfotriesterovou metodou jak je uvedeno v odborné literatuře) do zbývajících EcoRI místa bezprostředně sousedícího s XbaI místem. Dvacet mikrogramů pdeltaRIsrC se úplně rozštěpí působením EcoRI, extrahuje se fenolem a etherem a vysráží se ethanolem. Plasmid se pak štěpí 100 jednotkami nukleasy S1 při 16 °C 30 minut ve 25mM octanu sodném (pH = 4,6), 1mM chloridu zinečnatém a 0,3M chloridu sodném. Vytvoří

se tak zarovnané konce se sekvencí ATG. Po extrakci fenolem a etherem a po vysrážení ethanolom se DNA rozštěpí Bam HI, podrobí se elektroforese na 6% polyakrylamidovém gelu a elektroelucí se izoluje velký vektorový fragment (o 4300 bp).

Expresní plasmid byl připraven ligací 0,2 μ g vektoru, 0,02 μ g 92 bp PstI fragmentu se zarovnanými konci a 0,25 mikrogramů 1 400 bp částečného PstI-BamHI fragmentu spolu se 400 jednotkami T4 DNA ligasy přes noc při 12 °C. Tento plasmid byl použit pro transformaci *E.coli* kmene 294 (ATCC č. 31446) na ampicilinovou resistenci. Plasmidové DNA se připraví z 96 kolonií a štěpí se účinkem Xba I a Pst I. Devadesát z těchto plasmidů obsahuje žádané 103 bp XbaI-PstI a 1050 bp Pst I fragmenty. Sekvenční analýza DNA potvrdila, že některé z těchto plasmidů mají ATG iniciační kodon správně umístěn na počátku kódovací oblasti hovězího interferonu. Pro další studii byl vybrán jeden z těchto plasmidů - pBoIFN- Δ trp55.

I. Přímá exprese druhé třídy maturačního hovězího leukocytového interferonu (Δ 4) v *E.coli*

ATG iniciační kodon se umístí do čela maturační kódovací oblasti enzymatickým rozšířením primeru syntetické DNA, CATGTGTGACTTGTCT. Tento heptadekamer se fosforyluje T4 polynukleotid - kinasou a γ -³²P ATP jak bylo dříve v literatuře popsáno. 250 pikomolů primeru se spojí s přibližně 1 mikrogramem 319 bp HindII fragmentu, který obsahuje aminokyselinové zbytky 520 až 102, ve 30 mikrolitrech vody, vaří se pět minut a pak se 3 hodiny při 37 °C nastavuje 25 jednotkami *E.coli* DNA polymerasy I (Klenowův fragment). Produkt této reakce se štěpí působením HgiAI. Výsledný 181 bp zarovnaný HgiAI fragment se izoluje ze 6% polyakrylamidového gelu.

Celý gen pro maturační peptid byl sestaven za trp promotorem enzymatickou ligací shora uvedeného fragmentu s 508 bp HgiA-PstI fragmentem obsahujícím koncovou karboxy-část peptidu a HuIFN- γ expresním plasmidem, pIFN- γ trp-13, který byl štěpen EcoRI, na koncích nastaven Klenowovou DNA polymerasou, rozštěpen PstI a konečně izolován na 6% polyakrylamidovém gelu. Po transformaci výsledné směsi do *E.coli* 294 bylo identifikováno několik klonů, které mezi oblastí s trp promotor-ribosomovým vazebným místem původního expresního vektoru a kompletní kódovací oblastí maturačního hovězího interferonu pBoIFN- Δ 4trp15 měly obnovené EcoRI rozpoznávací místo.

J. Subklonování genů hovězího fibroblastového inteferonu.

Šest fágových rekombinantů, které se hybridizují lidskou IFN- β DNA sondou, se vyčistí. Jejich DNA se izoluje jak shora popsáno pro další analýzu. Restrikční mapování spolu s Southern-hybridizační analýzou ukazují, že 6 izolovaných rekombinantů obsahuje tři různé oblasti hovězího genomu, takže v sobě zahrnují multigen (mnohagen) BoINF- β seskupení. Tyto výsledky jsou sumarizovány restrikčními mapami, které jsou uvedeny na obr. 7. Aby se získala podrobnější restrikční mapa a sekvence nukleotidů pro každé další třídy rekombinantů, byly hybridizační fragmenty subklonovány na plasmidové vektory. Tak 5kb BglII fragment fága λ 31 a 5kb BamHI fragment λ 32 byly individuálně klonovány na pBR322 v BamHI místě; překrývající 4,5 kb EcoRI-XhoI a 1,4 kb PstI-HpaI fragmenty fága λ 33 byly vloženy do pUC9, respektive do pLeIF87.

K. DNA sekvence genů tří různých hovězích fibroblastů.

Na obr.8 jsou uvedeny restrikční mapy všech tří typů genů hovězích IFN- β , které byly subklonovány. Lze je snadno rozlišit podle unikátních míst štěpení. Peptidové kódovací oblasti a sekvence v dolním i horním vlákně každého genomu byly stanoveny Maxam-Gilbertovým chemickým postupem a jsou uvedeny v obr. 9a, 9b a 9c. Nukleotidová homologie se sekvencí určenou pro gen lidského fibroblastového inteferonu předpovídá správnou čtecí formu a úplnou aminokyselinovou sekvenci produktu každého hovězího genu; zahrnuje hydrofóbní signální peptid 21 aminokyselinový následovaný maturačním proteinem se 185 zbytky. Hovězí proteiny se navzájem liší (tabulka 2, obr. 10), ale ještě větší jsou rozdíly mezi hovězími a lidskými

peptidy (přibližně 60 %).

Multigenní (mnohagenní) povaha hovězího fibroblastového inteferonu byla dále demonstrována rehybridizací Southern -blotu, radioaktivní sondou připravenou ze 415 bp EcoRI-PvuI fragmentu odvozeného od pBoIFN- β 1trp (který je popsán níže). Tento experiment prokazuje existenci dalších homologních IFN- β genů. Méně hybridizované pásy mohou ve skutečnosti představovat vzdálenější související geny, které by pak dále kódovaly vzdálenější β -interferony.

T a b u l k a 2

Srovnání homologie kódovacích sekvencí hovězích β -interferonů (IFN- β) a lidského β -interferonu (HuIFN- β)

	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$	Hu β
$\beta 1$		138 (83)	138 (83)	84 (51)
$\beta 2$	20(95)		146 (88)	92 (55)
$\beta 3$	20(95)	19 (90)		87 (52)
Hu β	16(76)	17 (81)	16 (76)	

V tabulce je pro každý pár kódovacích sekvencí uveden počet stejných aminokyselin. Signální peptidy o 21 aminokyselinách jsou srovnávány v dolní levé části tabulky, maturationí IFN- β interferony o 166 aminokyselinách jsou srovnávány v horní pravé části tabulky. Prvé číslo znamená celkový počet shodných aminokyselin příslušného páru, v závorce je uvedeno procento homologie.

L. Přímá exprese tří hovězích IFN- β v E.coli

Jelikož geny tří hovězích IFN- β mají mnoho společných DNA sekvencí a restrikčních míst (viz obr. 8), je možné schéma pro expresi všech tří genů. Jelikož DNA sekvence kódující prvních pět aminokyselin, která obsahuje dvě AluI místa, jsou ve všech případech identické, byly navrženy dva komplementární syntetické oligonukleotidy, které zahrnují ATG translační iniciační kodon, restaurují kodony prvních čtyř aminokyselin maturationího hovězího IFN- β a vytvářejí EcoRI přečnickující konce pro inserci za trp promotorovou sekvenci. Konstrukce expresních plasmidů je schematicky uvedena na obr. 12. Ligací syntetických oligomerů na 85 bp AluI-XhoI fragment, který je odvozen od BoIFN- β subklonovaných plasmidů, a následujícím odštěpením působením EcoRI a XhoI vznikne 104 bp fragment obklopený přečnickujícími EcoRI a XhoI konci. Úplný kód se pak vnese do trp expresního vektoru ligací 104 bp fragmentu s přibližně 700 bp XhoI-PstI fragmentem kódujícím zbytek BoIFN- β proteinu a plasmidu pIFN- β tr48-13, ze kterého byl vnitřní EcoRI-PstI fragment odstraněn. Všechny výsledné plasmidy, pBoIFN- β 1trp, pBoIFN- β 2trp a pBoIFN- β 3trp, provádějí příslušné transkripce a translace IFN- β genů pod kontrolu E.coli trp operonu.

M. Charakterizace a subklonování genu hovězího imunního interferonu (BoIFN- β)

Deset fágových rekombinantů, které byly hybridizovány sondou lidského IFN- β , se vyčistí. DNA se připraví jak shora popsáno. Všechny deset DNA vzorků dává Southern blotovou analýzou specifické hybridizační pásy. Pro další analýzu se vyberou klony $\lambda \beta 4$ a $\lambda \beta 7$, protože se liší vzorem hybridizačních pásů. Restrikční zmapování těchto dvou klonů ukazuje, že se jejich DNA sekvence navzájem překrývají. Překrývající oblasti obsahují restrikční místa XbaI, EcoRV a NcoI. DNA sekvenční analýza těchto dvou klonů ukazuje, že genová struktura je celkově podobná genu lidského imunního interferonu a dále že $\lambda \beta 7$ obsahuje

sekvenci kódující čtvrtý exon a λ 7.4 obsahuje sekvenci kódující první tři exony genu hovězího IFN- γ ve vztahu k homologii DNA sekvence s genem lidského IFN- γ . V obr. 13 je aminokyselinová sekvence odvozená pro BoIFN- γ srovnávána s aminokyselinovou sekvencí HuIFN- γ a myšího IFN- γ .

Pro sestavení úplného genu hovězího IFN- γ na kontinuálním segmentu DNA byly izolovány: 3000 bp BamHI-NcoI fragment přemosťující první tři exony genu hovězího IFN- γ odvozené od λ 7.4 a 2500 bp NcoI-HindIII fragment přemosťující poslední exon odvozený od λ 7.7. Tyto dva fragmenty byly pak klonovány na BamHI-HindIII vektor odvozený od plasmidu pBR322 ligací tří částí.

N. Pro získání bezintronové verze BoIFN- γ , aby tak docházelo k expresi tohoto genu v prokaryotickém systému jako je *E. coli*, byl připraven gen pro expresi (ve vysokých hladinách) v expresním systému zvířecí buňky tak, aby se získala dostatečná množství specifické mRNA.

5500 bp BamHI-HindIII fragment přemosťující gen úplného hovězího IFN- γ byl vložen do SV40 vektoru pro expresi v COS (buňky opičí ledviny produkující SV-40⁺ antigen) buňkách. Genový fragment BamHI-HindIII hovězího IFN- γ byl klonován na 2800 bp SV40 plasmidový vektor pDdeltaR1 (odvozený od HBV antigenového expresního plasmidu pHBs348-L enzymatickým vynecháním EcoRI místa horního řetězce od SV40 počátku replikace selektivně ve směru pozdější transkripce. Expresní plasmid pHBs348-L byl konstruován klonováním 1986 bp fragmentu získaného štěpením HBV působením EcoRI a BglII (HBV přemosťuje gen kódující HBsAg) na plasmid pML v EcoRI a BamHI místech (pML je derivát pBR322, který má vynechány eliminační sekvence, které jsou inhibitory replikace plasmidu v buňkách opic). Výsledný plasmid (pRI-Bgl) byl pak linearisován působením EcoRI. 348 bp fragment, který představuje oblast SV40 počátku, byl vložen do EcoRI místa pRI-Egl. Fragment počátku se může vložit s libovolnou orientací. Jelikož fragment kóduje jak dřívější tak pozdější SV40 promotory vedle počátku replikace, mohlo by dojít k expresi HBV genů pod kontrolou kteréhokoliv promotoru závislého na této orientaci (k expresi pHBs348-L reprezentující HBs dochází pod kontrolou pozdějšího promotoru) mezi BamHI a SalI místem ligací tří částí za přítomnosti 600 bp HindIII-SalI fragmentu konvertoru odvozeného od pBR322.

Trasfekce výsledného plasmidu do COS buněk vede k efektivní expresi hovězího IFN- γ pod kontrolou SV-40 pozdějšího promotoru.

Poly A plus mRNA byla připravena z trasfektovaných COS buněk a použita pro přípravu cDNA standardními postupy, které jsou v odborné literatuře uvedeny. Byly izolovány cDNA klony hybridizované sondou genu hovězího IFN- γ . Pro další analýzu byl vybrán cDNA klon s nejdelším PstI insertem. DNA sekvenční analýza tohoto cDNA klonu ukazuje, že všechny intronové sekvence genomového klonu hovězího IFN- γ jsou správně odstraněny.

Pro expresi v *E. coli* byla připravena shora popsanou metodou závislou na primeru cDNA.

0. Příprava bakteriálních extraktů.

Kultury vyrostlé přes noc v LB půdě obsahující buď 0,02 mg/ml ampicilinu nebo 0,005 mg/ml tetracyklinu se naočkuje ve zředění 1 : 100 do 50 ml média M9, které obsahuje 0,2 procenta glukosy, 0,5 % kasaminokyselin a příslušnou sloučeninu, a kultivují se při 37 °C za třepání do $A_{550} = 1,0$. Deset mililitrů vzorku se odcentrifuguje a ihned se nechá rychle zmrazit v lázni se suchým ledem a ethanolem. Zmrazené pelety se resuspendují v 1 ml 7M guanidinu, inkubují se 5 minut v ledu a pro testování se zředí PBS (fosfátový pufr ve fyziologickém roztoku). Nebo se zmrazené pelety rozloží přidáním 0,2 ml 20% sacharosy, 100mM Tris-HCl (pH = 8,0), 20mM EDTA a 5 mg/ml lysozomu. Po dvaceti minutách v ledu se přidá 0,8 ml 0,3% Tritonu (reionogenní detergent) X-100, 0,15M Tris-HCl (pH = 8,0), 0,2M EDTA a 0,1mM PMSF (fenylmethylsulfonylfluorid). Lysát se vyčistí 15 minutovou centrifugací při 19 000 otáčkách za minutu. Supernatant se testuje po zředění PBS.

P. Interferonové testy; účinnost hovězího interferonu se testuje testem inhibice cytopathického efektu (CPE) v mikrotitrovacích destičkách s 96 jamkami následujícím způsobem:

1. Do každé jamky desky (8 řad x 12 sloupců) se dá 100 μ l suspenze buněk v mediu, které obsahuje 10 procent plodového séra telat. Koncentrace buněk se upraví tak, aby se další den získala jedna tekutá vrstva.

2. Desky se deset minut mírně třepou. Dojde tak ke stejnoměrné distribuci buněk.

Další den:

3. Do každé jamky prvního sloupce se přidá 80 μ l dalšího média.

4. Do jamek prvního sloupce se přidá 20 μ l vzorku, který se testuje na interferonovou účinnost.

5. Vzorek a médium v jamce se promíchá tak, že se 100 μ l pipetou několikrát odebere z obsahu jamky a opět se do jamky přidá.

6. Z jamky v prvním sloupci se odebere 100 μ l obsahu a přenesse se horizontálně do jamky ve druhém sloupci.

7. Pokračuje se jako (ve třetím sloupci) ve stupni tři.

8. Takto se pokračuje v přemísťování 100 μ l obsahů jamek do následujících sloupců, dokud se nezaplní všechny sloupce (tj. dojde k jedenácti přemístěním).

9. Z jamky ve dvanácté koloně se odstraní 100 mikrolitrů obsahu. Tímto postupem se získala řada dvojnásobných zředění.

10. Každá testovaná deska obsahuje příslušné NIH standardy.

11. Desky se inkubují 24 hodin při 37 °C v CO₂.

12. Každá testovaná deska obsahuje jamky se 100 μ l buněčné suspenze a 100 μ l média (kontrola růstu buněk) a jamky se 100 μ l buněčné suspenze, 100 μ l média a 50 μ l virové suspenze (virem indikovaná cytopathogenní kontrola).

13. Do všech jamek s výjimkou jamek s kontrolními buňkami se přidá 50 mikrolitrů virové suspenze. Multiplicita infekce je dána množstvím viru, které způsobí 100% cytopathický efekt příslušné buněčné linie během 24 hodin.

14. Desky se reinkubují 24 hodin při 37 °C v CO₂.

15. Kapalina se s desek odstraní a buňky se obarví 0,5% krystalovou violetí. Buňky se barví dvě až pět minut.

16. Jamky desek se propláchnou vodou a vysuší se.

17. Titr interferonu ve vzorku je převratnou hodnotou zředění pro ten případ, kdy zůstává 50 % živých buněk.

18. Aktivita všech vzorků se normalizuje konverzním faktorem referenčních jednotek, který se počítá takto:

$$\frac{\text{skutečný titr NIH standardu}}{\text{pozorovaný titr v testu}} = \text{konverzní faktor ref. jednot.}$$

(NIH - národní ústav zdraví)

Extrakty připravené z E.coli kmen 294 (ATCC č. 31446) transformované pBoIFN- α 1trp55 vykazovaly významnou aktivitu na buněčné linie hovězích ledvin (MDBK) s VS virem (kmen Indiana), ale nikoliv na buněčné linie opičích ledvin (VERO), lidského cervikálního karcinomu (HeLa), králíčích ledvin (RK-13) nebo myši (L929). Kontrolní extrakty připravené z kmene 294 transformované pBR322 nevykazovaly aktivitu na MDBK buňky. V tabulce 3 jsou

souhrnně uvedeny *in vitro* antivirové aktivity BoIFN- α 1 pro různé testované zvířecí a lidské buněčné linie. BoIFN- α 1 je snadno odlišitelný od lidských leukocytových IFN tím, že je v lidských buňkách zřetelně protivirově inaktivní ve srovnání s jeho protivirovou účinností v hovězích buňkách (byl použit virus VS). V tabulce 4 jsou uvedeny hladiny interferonové aktivity získané v extraktech, které byly připraveny z *E.coli* W3110 transformované expresními plasmidy pBoIFN- α 4trp15, pBoIFN- β 1trp, pBoIFN- β 2trp a pBoIFN- β 3trp. Zvláště významné je pozorování, že hovězí fibroblastové interferony jsou přibližně třicetkrát účinnější na buněčné linie hovězích ledvin než na buněčné linie lidského anionu, zatímco pro lidský fibroblastový IFN byl nalezen převrácený vztah.

T a b u l k a 3

buněčná linie	připravený IFN	titr (jednotky/ml)	
		VSV	EMCV
MDBK	LeIF A standard	640	NA
	hovězí leukocytový IFN	300 000	NA
	kontrolní extrakt	< 40	NA
HeLa	LeIF A standard	650	1 500
	hovězí leukocytový IFN	< 40	< 23
	kontrolní extrakt	< 40	< 23
L-929	myší IFN standard	640	1 000
	hovězí leukocytový IFN	< 20	< 31
	kontrolní extrakt	< 20	< 31
RK-13	králičí IFN standard	1 000	NA
	hovězí leukocytový IFN	< 60	NA
	kontrolní extrakt	< 60	NA
VERO	LeIF A standard		1 500
	hovězí leukocytový IFN		< 12
	kontrolní extrakt		< 12

MDBK = buňky hovězích ledvin

VERO = buňky ledvin afrických zelených opic ("African green")

HeLa = buňky lidského cervikálního karcinomu

RK-13 = buňky králičích ledvin

Na = neaplikovatelné, neboť nedochází k dobré replikaci viru
v příslušných buňkách

T a b u l k a 4

Interferonová účinnost v extraktech E.coli

<u>E.coli</u> 294 transformované účinkem:	IFN- β aktivita (jednotky/litr kultury) MDBK-VSV	IFN- β aktivita (jednotky/l kultury) WISH-VSV
pIFN- β 1	1,0 . 10^8	nestanoveno
pIFN- β 1	2,2 . 10^8	6,5 . 10^6
pIFN- β 2	1,1 . 10^8	3,5 . 10^6
pIFN- β 3	6,0 . 10^8	2,0 . 10^7

Bakteriální extrakty byly připraveny a testovány na interferonovou účinnost použitím buněčných linií hovězích ledvin (MDBK) a buněčných linií lidského amnionu (WISH) proti VSV podle dříve publikovaného postupu (Wech a spol. 1981).

Sloučeniny podle tohoto vynálezu lze formulovat známými způsoby. Vyrábějí se tak farmaceuticky užitečné prostředky, které obsahují zvířecí interferonové produkty podle vynálezu ve směsi s přijatelným (přijatelnými) nosičem (nosiči). Vhodná pojiva a jejich formulace byly již dříve v literatuře popsány. Takové prostředky obsahují efektivní množství interferonového proteinu podle vynálezu spolu s vhodným pojivem. Vyrábí se tak přijatelné prostředky, které jsou vhodné pro efektivní podávání známými způsoby, například parenterálně, hostiteli.

Tomu je třeba rozumět tak, že zvířecí interferony, které jsou zahrnuty v rozsahu tohoto vynálezu, existují v přirozených alelických variacích. Tyto variace mohou představovat rozdíl(y) v aminokyselině (aminokyselinách) v sekvenci nebo vynechání, substituci, inserci, inverzi nebo adici aminokyselin(y) v sekvenci. V rozsahu tohoto vynálezu jsou všechny takové alelické variace zahrnuty.

Je třeba připomenout, že tento vynález není konstruován tak, aby byl uvedenými zvláště vhodnými uspořádáními omezen, ale je omezen pouze rozsahem připojeného předmětu vynálezu.

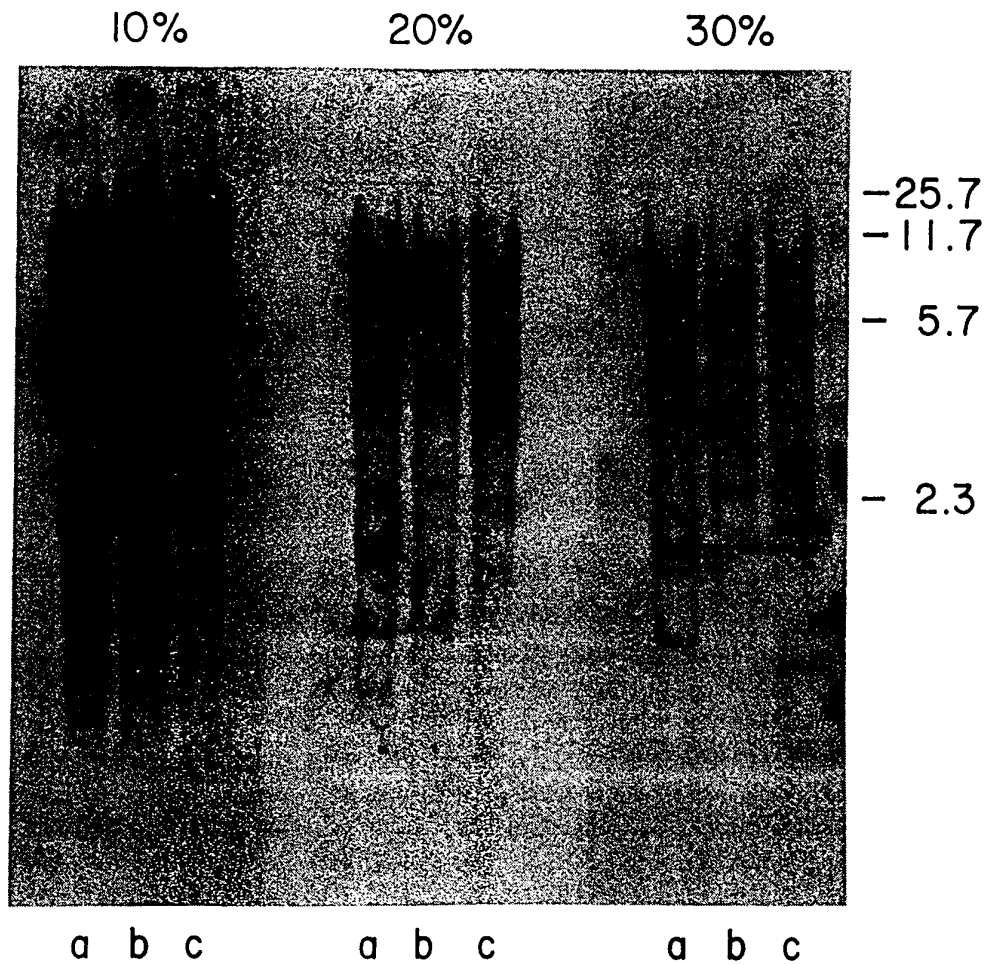
P Ř E D M Ě T V Y N Á L E Z U

1. Způsob výroby polypeptidu se sekvencí aminokyselin zvířecího interferonu, vyznačující se tím, že se kultivuje mikroorganismus typu E.coli nebo kvasinek nebo buněčná kultura typu CHO buněčná linie, transformované replikabilním vektorem schopným exprese DNA sekvence kódující uvedený polypeptid a vzniklý polypeptid se izoluje.

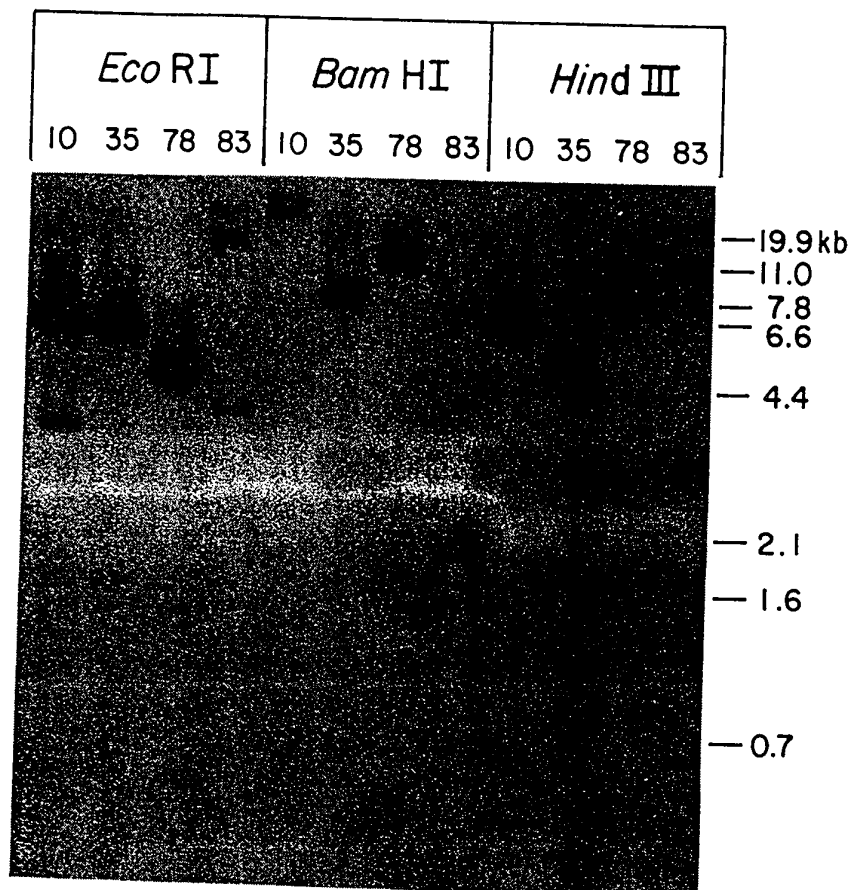
2. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se izoluje polypeptid bez přirozené glykosylace.

3. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se izoluje **polypeptid** ve zralé formě.

4. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se izoluje polypeptid typu hovězího interferonu.



Obt. 1.



Obr. 2.

CS 274401 B2

GGATCCACAGCATAAATGTGTTGTACAATTTACGGTGGGGTAATTAGGAAAAAAATCTCAGAAGAACTGTCAATAGGGGAAGGGGGGCAATAATGAAAAACAGTTTGCGAA
50 100
ATGCTGTCCTAACCCATTGTAAGAGTACAACTGAAAAACAAAAACAAAGTAGAAGCAAGAGGGAACCTTCAGAAAATGGAACCATGGACTCTATTAAAGACACAGACCTGAAGG
150 200
AAGGTCTTCAGAGAACCTAGAAAGCAGGTTACAGAGTCACCCACCGCCAGGCCACAAGCATCTTCAAGGTCCCG 51 10
met ala pro ala trp ser leu leu leu ala
250 300 ATG GCC CCA GCC TGG TCC CTC CTC CTG GCT
leu leu leu leu ser cys asn ala ile cys ser leu gly cys his leu pro his ser his ser leu ala lys arg arg val leu thr leu
350 400 CTG CTG CTG CTC AGC TGC AAC GCC ATC TGC TCT CTG GGC TGC CAC CTG CCT CAC TCC CAC AGC CTG GCC AAG AGG AGA GTC CTG ACA CTC
LEU ARG GLN LEU ARG ARG VAL SER PRO SER SER CYS LEU GLN ASP ARG ASN ASP PHE ALA PHE PRO GLN GLU ALA LEU GLY GLY SER GLN
450 500 CTG CGA CAA CTG AGG AGG GTC TCC CCT TCC TCC TGC CTG CAG GAC AGA AAT GAC TTC GCA TTC CCC CAG GAG GCG CTG GGT GGC AGC CAG
LEU GLN LYS ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU VAL THR GLN HIS THR PHE GLN LEU PHE SER THR GLU GLY SER ALA ALA VAL TRP
550 600 TTG CAG AAG GCT CAA GCC ATC TCT GTA CTC CAC GAG GTG ACC CAA CAC ACC TTC CAG CTT TTC AGC ACA GAG GGC TCG GCC GCT GTG TGG
ASP GLU SER LEU LEU ASP LYS LEU ARG THR ALA LEU ASP GLN GLN LEU THR ASP LEU GLN ALA CYS LEU ARG GLN GLU GLU GLY LEU PRO
650 700 GAT GAG AGC CTC CTG GAC AAG CTC CGC ACT GCA CTG GAT CAG CAG CTC ACT GAC CTG CAA GCC TGT CTG AGG CAG GAG GAG GGG CTG CCA
GLY ALA PRO LEU LEU LYS GLU ASP SER SER LEU ALA VAL ARG LYS TYR PHE HIS ARG LEU THR LEU TYR LEU GLN GLU LYS ARG HIS SER
750 800 GGG GCT CCC CTG CTC AAG GAG GAC TCC AGC CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAC AGA CTC ACT CTC TAT CTG CAA GAG AAG AGA CAC AGC
PRO CYS ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLN VAL MET ARG ALA PHE SER SER THR ASN LEU GLN GLU ARG PHE ARG ARG LYS ASP OP
800 850 CTT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA CAA GTC ATG AGA GCC TTC TCT TCC TCA ACA AAC TTG CAG GAG AGA TTC AGG AGA AAG GAC TGA
CACACACCTGGTTCAACACGAAATGATTCTCACGGACCAACAGACCACACTTCCTCCTGCGCTGCATGTGGAAGACTCATTCTGCTGTGCATCAGGCAGTGAACGAATCAATTTGTT
900 950 1000
AAATGATTTTCAGGTATATTATGTGACATCATGATCTACTCTACAGGCACACTCTGTCCAGATACTCAAGCTAATCCATCTACTTATTTATCTATTTGGTATTTTATTTATCTAATTTAA
1050 1100
TATTTATTTATCTATATATAAGAATTAATTTGTTTCATATAATTATGTATGATAATTAATGAAAAATATATTTTGTATTTAGTCAATTTATGAGTTTCTTCATTCTAATAAC
1150 1200
CTTACTATAAAAATCTCCTTTGTTTTCTTTAAAAAGAAACATGAAGACTGAATATGCAACTTGATTAAAGAATGCATTTTATAATTCCTTACCCATTTTGTGATTTGCACATTA
1250 1300 1350
CAAATGGGGATTTTGGGGGATTTCTGACCGGAACCTGGAAGCGACCACTGAAAGAAGGACACTCAGACAGTCTCTTGAAGGACTGACAAGTTTATTTTC
1400 1450

Obr.3a

BoIFN-α2

GAAAAAATATCTAAAAGGCTCTGTGGGCAGAAGAAAGAGCAACATGAAAAAATGATTGGGTAGTCAGCCC
 TAACCCACTGGAGAGTGCAAACTGAAAAGCAAAACAAAAGTAGAAAAAAGAGGGAACCTTTCACAAAGTGGAACCAT
 GGGCTCCTATTTAAGACACAGGCCTGAAGGAAGGTCTTCAGAGAATCTAGAGAGCAGGTTACAGAGTCACCCACTGCC

S1 S10
 met ala pro ala trp ser phe leu leu ala leu leu
 CCAGGGCAGAAGCATCTGCAAGGTCCCCG ATG GCC CCA GCC TGG TCC TTC CTC CTG GCC CTG CTG

S20 S23 1
 leu leu ser cys asn ala ile cys ser leu gly cys his leu pro his thr his ser leu
 CTG CTC AGC TGC AAC GCC ATC TGC TCT TTG GGT TGC CAC CTG CCT CAC ACC CAC AGC CTG

20
 pro asn arg arg val leu thr leu leu arg gln leu arg arg val ser pro ser ser cys
 CCC AAC AGG AGG GTC CTG ACA CTC CTG CGA CAA CTG AGG AGG GTC TCC CCT TCC TCC TGC

40
 leu gln asp arg asn asp phe ala phe pro gln glu ala leu gly gly ser gln leu gln
 CTG CAG GAC AGA AAT GAC TTT GCA TTC CCC CAG GAG GCG CTG GGT GGC AGC CAG TTG CAG

60
 lys ala gln ala ile ser val leu his glu val thr gln his thr phe gln leu phe ser
 AAG GCT CAA GCC ATC TCT GTG CTC CAC GAG GTG ACC CAG CAC ACC TTC CAG CTC TTC AGC

80
 thr glu gly ser ala ala val trp asp gln ser leu leu asp lys leu arg ala ala leu
 ACA GAG GGC TCG GCC GCT GTG TGG GAC CAG AGC CTC CTG GAC AAG CTC CGA GCT GCA CTG

100
 asp gln gln leu thr asp leu gln ala cys leu arg gln glu glu gly leu arg gly ala
 GAT CAG CAG CTC ACT GAC CTG CAA GCC TGT CTG AGG CAG GAG GAG GGG CTG CGA GGG GCT

120
 pro leu leu lys glu asp ala ser leu ala val arg lys tyr phe his arg leu thr leu
 CCC CTG CTC AAG GAG GAT GCC AGC CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAC AGA CTC ACT CTC

140
 tyr leu gln glu lys arg his ser pro cys ala trp glu val val arg ala glu val met
 TAT CTG CAA GAG AAG AGA CAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA GTC ATG

160 166
 arg ala phe ser ser ser thr asn leu gln glu lys phe arg arg lys asp OP
 AGA GCC TTC TCT TCT TCA ACA AAC TTG CAG GAG AAA TTC AGG AGA AAG GAC TGA CACACA

CCTGGTTCAACACGGAATGATTCTCATGGACCAACAGACCACACTTCTCCTGCACTGCCATGTGGAAGACTCTCAT
 TTCTGCTGTCAATTGCACCTGAAATGAATCAATATGTCAAATGATTTCTGGAATATTAAGTAACATCATGTTCTACTC
 TATAGGCAAAACAGATGCCGAAGCTCATCTATCTACATATTTAACTACTTGGACATTTATTTATTTATTTAATATTT
 ATTTAACTATTTATAAATATTTAAATTATTTTGTGATAAAGTATTATGTATGTACATTTAGGGGAAATGTATATTT
 TGTATTTAGTCAGTTTATGATTTTTCTTCTTTATTTAAATTTTACTGTAAAAGACTTACTTTGTTTTTCGTTAAAA
 CAGAGCCACCAAGCCTGAATGGCAGCTTGATTAATAATGCAATTTTATGATTCCTTGAGCCCTTTTAGGATCTGCAT
 GTTAGAAGTAAAAATACTCTAGCTCTAGCTATGTTTTTGTGCTCTGAGGACCTTGAAGGGAACATAACCACTCCAG
 TGCTTTTGTAACTCTGATTTTTTTTCAAAAAAAGTAACCTAAAAACAACCATCAAAAAAATCCATGCTTCAG
 GATTTGATGAATTC

Obr.3b

[illegible]

Q7.4b

BoIFN-α3

GGATCCACAGCATAAATGTGTTGTCACAATTTACGGTGGGGTAATTAGTAAAAAAAAAATTTCAGAAGACTCTGTC
 AATAGGGGAAGGGGGTCAATAATGAAAACAACGTTTGCAAAATGCTGTCCTAAACCCATTGGAGAGTGCAAAATGAA
 AAACAAAAACAAAGTAGAAAGCAAGAGGGAACTTTCAGAAAATGGAACCATGGGCTCCTATTTAACACACAGGCCTG
 AAGGAAGGTCTTCAGAGAACCTAGAAAGCAGGTTACAGAGTCACCCACCTCCCAGGCCACAAGCATCTGCAAGGTCC

S1 S10
 met ala pro ala trp ser leu leu leu ala leu leu leu leu ser cys asn ala ile
 CCA ATG GCC CCA GCC TGG TCC TTA CTG CTG GCC CTG CTG CTG CTC AGC TGC AAT GCC ATC

S20 S23 1 10
 cys ser leu gly cys his leu pro his thr his ile leu ala asn arg arg val leu met
 TGC TCT CTG GGC TGC CAC CTG CCT CAC ACC CAC ATC CTG GCC AAC AGG AGG GTC CTG ATG

20 30
 leu leu gly gln leu arg arg val ser pro ser ser cys leu gln asp arg asn asp phe
 CTC CTG GGA CAA CTG AGG AGG GTC TCC CCT TCC TCC TGC CTG CAG GAC AGA AAT GAC TTT

40 50
 ala phe pro gln glu ala leu gly gly ser gln leu gln lys ala gln ala ile ser val
 GCA TTC CCC CAG GAG GCG CTG GGT GGC AGC CAG TTG CAG AAG GCT CAA GCC ATC TCT GTG

60 70
 leu his glu val thr gln his thr phe gln leu phe ser thr glu gly ser ala thr met
 CTC CAC GAG GTG ACC CAG CAC ACC TTC CAG CTT TTC AGC ACA GAG GGC TCG GCC ACC ATG

80 90
 trp asp glu ser leu leu asp lys leu arg asp ala leu asp gln gln leu thr asp leu
 TGG GAT GAG AGC CTC CTG GAC AAG CTC CGC GAT GCA CTG GAT CAG CAG CTC ACT GAC CTG

100 110
 gln phe cys leu arg gln glu glu glu leu gln gly ala pro leu leu lys glu asp ser
 CAA TTC TGT CTG AGG CAG GAG GAG GAG CTG CAA GGA GCT CCC CTG CTC AAG GAG GAC TCC

120 130
 ser leu ala val arg lys tyr phe his arg leu thr leu tyr leu gln glu lys arg his
 AGC CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAC AGA CTC ACT CTC TAT CTG CAA GAG AAG AGA CAC

140 150
 ser pro cys ala trp glu val val arg ala gln val met arg ala phe ser ser ser thr
 AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA CAA GTC ATG AGA GCC TTC TCT TCC TCA ACA

160 166
 asn leu gln glu ser phe arg arg lys asp OP
 AAC TTG CAG GAG AGT TTC AGG AGA AAG GAC TGA CACACCTGGTTCAACACGGAAATGATTCTCATGG

ACCAACAGACCACACTTCCTCCTGCGCTGCCATGTGGAAGATTCAATTTCTGCTGTCATCAGGCACTGAAGTGAATCAA

TTTGTTAAATGATTTTCAGGTATATTAAGCGACATCATGATCTACTCTACAGGCACTACTCTGTCCCGGATACTCAAGC

TAATCCATCTACTTATTTATCTATTTGGATATTTATTTATCTAATTTAATATTTATTTATCTATATATAAAGAATTAA

ATTATTTGTTTCATATAATTATGTATGTATACTTAAGGGAAAAATATATTTGTATTTAGTCAATTTATGAGTTTTCT

TCATTCATTAAACCTTACTATAAAAAATCTTCCTTTGTTTTCTTTAAAAAAGAAACATGAAGACTGAATACGCAACTT

GATTAAAGAATGCATTTTACAATTCCTTCACCCATGTTTGTGATTTCACATTACAAGTGTGGGGATTTCTCCTCG

GGACTTGAAGCGACGAACCTGAAAGAAGGACGGACAGTCTCTTGCAAGGACTGAC

BoIFN- α 4

TCTAGAAGGAAAAGAAACATGGGAGGAGCTCATGGACTCACAATAATCAGCCTCTTCTCTAAATCAAACACTCAAGAAA
 ACCCATCCTTTGTTTCAAACAGTTTCTTTGCTAGAGTGACCTGGTAAATGCCTGATAAACACAGAGCCTGCCTTCCTAA
 GTAAAGTAAGAAACAGAAATAAGCCTAGGATCAGGGCCAAAAATGTGTTTCATGAACAGAAAAGGCCACATTTACACAT
 GAAGAGAAAAGTGATATGTTTGTACTTAGAACTACATCATTTCTAATGTAAGACAAAGACCTTTCTCATTTTGATTGA
 TAAATATCCATTTGGATGGGTACATTTGAAGTTATTGGGAAATAGATAAAAGTAATAGTTTAGACTGATGACAATTTCT
 TTGACCATATTCGGAATACATAATGAAAATCAAAAAAGGAAGTACAAGTACACAGAAATGACTAGAAAATGAAAATTA
 CTGTGTTCCCTATTTAATGGCCTTGCTTAGAAAGCATGGCATCAGAGAACCTACCTCAAGGTTCCACCAGACGCTGTCT

S1 S10
 met ala phe val leu ser leu leu met ala leu val
 CAGCCAGCCCAGCAGCAGCCTCATCTTCCCC ATG GCC TTC GTG CTC TCT CTA CTG ATG GCC CTG GTG

S20 S23 1
 leu val ser tyr gly pro gly gly ser leu gly cys asp leu ser pro asn his val leu
 CTG GTC AGC TAT GGC CCG GGA GGA TCC CTG GGC TGT GAC TTG TCT CCG AAC CAC GTG CTG

10 20
 val gly arg gln asn leu arg leu leu gly gln met arg arg leu ser pro arg phe cys
 GTT GGC AGG CAG AAC CTC AGG CTC CTG GGC CAA ATG AGG AGA CTC TCC CCT CGC TTC TGT

30 40
 leu gln asp arg lys asp phe ala phe pro gln glu met val glu val ser gln phe gln
 CTG CAG GAC AGA AAA GAC TTT GCT TTC CCC CAG GAG ATG GTG GAG GTC AGC CAG TTC CAG

50 60
 glu ala gln ala ile ser val leu his glu met leu gln gln ser phe asn leu phe his
 GAG GCC CAG GCC ATT TCT GTG CTC CAT GAG ATG CTC CAG CAG AGC TTC AAC CTC TTC CAC

70 80
 lys glu arg ser ser ala ala trp asp thr thr leu leu glu gln leu leu thr gly leu
 AAA GAG CGC TCC TCT GCT GCC TGG GAC ACT ACC CTC CTG GAG CAG CTC CTC ACT GGA CTC

90 100
 his gln gln leu asp asp leu asp ala cys leu gly leu leu thr gly glu glu asp ser
 CAT CAG CAG CTG GAT GAC CTG GAT GCC TGT CTG GGC CTG TTG ACT GGA GAG GAA GAC TCT

110 120
 ala leu gly arg thr gly pro thr leu ala met lys arg tyr phe gln gly ile his val
 GCC CTG GGA AGG ACG GGC CCC ACA CTG GCC ATG AAG AGG TAC TTC CAG GGC ATC CAT GTC

130 140
 tyr leu gln glu lys gly tyr ser asp cys ala trp glu ile val arg leu glu ile met
 TAC CTG CAA GAG AAG GGA TAC AGC GAC TGT GCC TGG GAA ATC GTC AGA CTG GAA ATC ATG

150 160
 arg ser leu ser ser ser thr ser leu gln glu arg leu arg met met asp gly asp leu
 AGA TCC TTG TCT TCA TCA ACC AGC TTG CAA GAA AGG TTA AGA ATG ATG GAT GGA GAC CTG

170 172
 lys ser pro OP
 AAA TCA CCT TGA CATGACTCTCACTGACTAAGATGCCCCATCATCTTTGCACACTCATCTGTGGCCATTTCAAAA

GACTCTGATTTCTGTTGTAGCCACAAAATTTATTGAATTACTTCAGCCAATACTTTGTCTAGTAGTAATGAATATACA
 TAAATTTTTTTGGCTGCAGGTGCATCAGTCCCGAAGTGAAGACTGCCCTTATTTATTGTTTGCTTATTTATTTTGT
 ATATTTATCTTTTTATTTCTCATATTTATTTTCCATATAAAATTTTTGTGTTACATTGTATTAATTAACAAA
 TACATTAACATTTTTATTTTATTATTTGTAATTTGTTTATTTATTAATATTGTCAAGGTGAACCTCTTGAATTT
 TTTTACCGTTTTATGTTTAGTTGCCAGGTAAAGTCTGATTCTTTGTGACCCCATAGACTGTAGCCACCAGGCTCCT
 CTGTCCATGGGATGATCAGGCAAGACTACTGGAGTATGTTGCCATTTACAGGGGATCTCCAACCAAGGATGAAATC

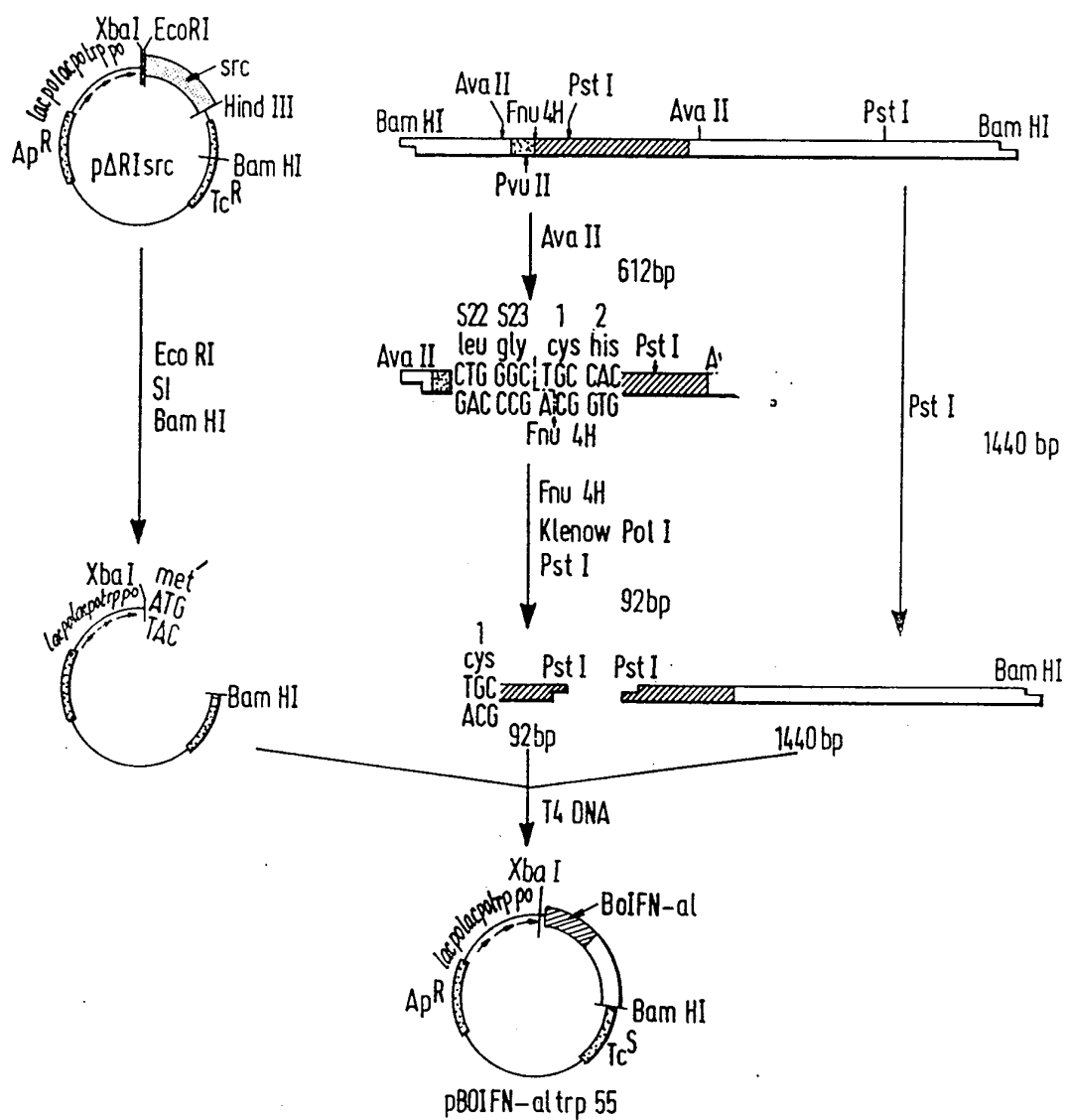
Obr. 3d

BoIFN-a1	MA P A W S L L L L A L L L L L S C N A I C S L G C H L P H S H S L A K R R R V L T L L R Q L R R V S P S S C L Q D R N D F A F P Q	1
BoIFN-a2	MA P A W S F L L L A L L L L L S C N A I C S L G C H L P H S H S L A K R R R V L T L L R Q L R R V S P S S C L Q D R N D F A F P Q	10
BoIFN-a3	MA P A W S L L L L A L L L L L S C N A I C S L G C H L P H S H S L A K R R R V L T L L R Q L R R V S P S S C L Q D R N D F A F P Q	20
BoIFN-a4	MA F V L S L L L A L L L L L S C N A I C S L G C H L P H S H S L A K R R R V L T L L R Q L R R V S P S S C L Q D R N D F A F P Q	30
leIF A	MA L T F A L L V A L L V L S Y K S F S S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	40
leIF B	MA L T F A L L V A L L V L S Y K S F S S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
leIF C	MA L S F S L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
leIF D	MA S P F A L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
leIF E	MA L S F S L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
leIF F	MA L S F S L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
leIF G	MA L S F S L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
leIF H	MA L S F S L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
leIF I	MA L S F S L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
leIF J	MA L S F S L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
leIF K	MA L S F S L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
All	MA F F S L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
All	MA P A W S L L L L A L L L L L S C N A I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
BoIFN-a1/	MA P A W S L L L L A L L L L L S C N A I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	
BoIFN-a4/	MA P A W S L L L L A L L L L L S C N A I C S L G C D L P Q T H S L G N R R A L I L L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F A F P Q	

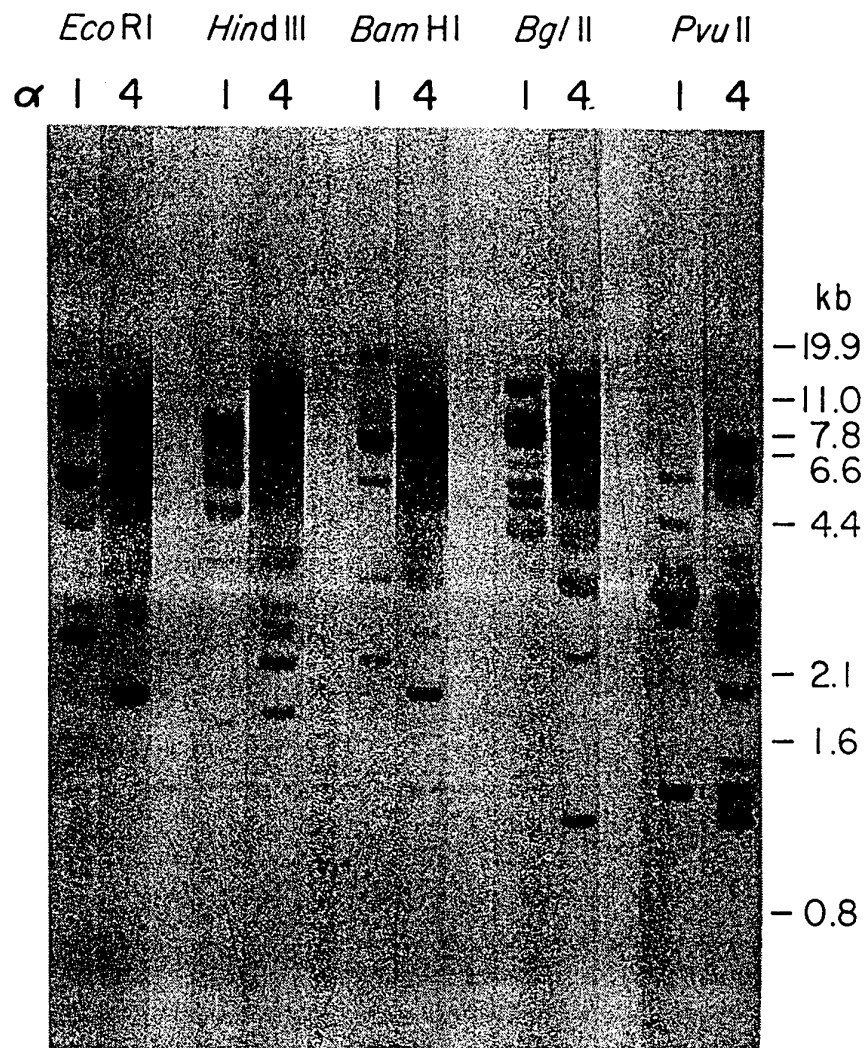
Obr. 4a

BoIFN- α 1
BoIFN- α 2
BoIFN- α 3
BoIFN- α 4
LeIF A
LeIF B
LeIF C
LeIF D
LeIF E
LeIF F
LeIF G
LeIF H
LeIF I
LeIF J
LeIF K
A11
A11
BoIFN- α 1/
BoIFN- α 4/

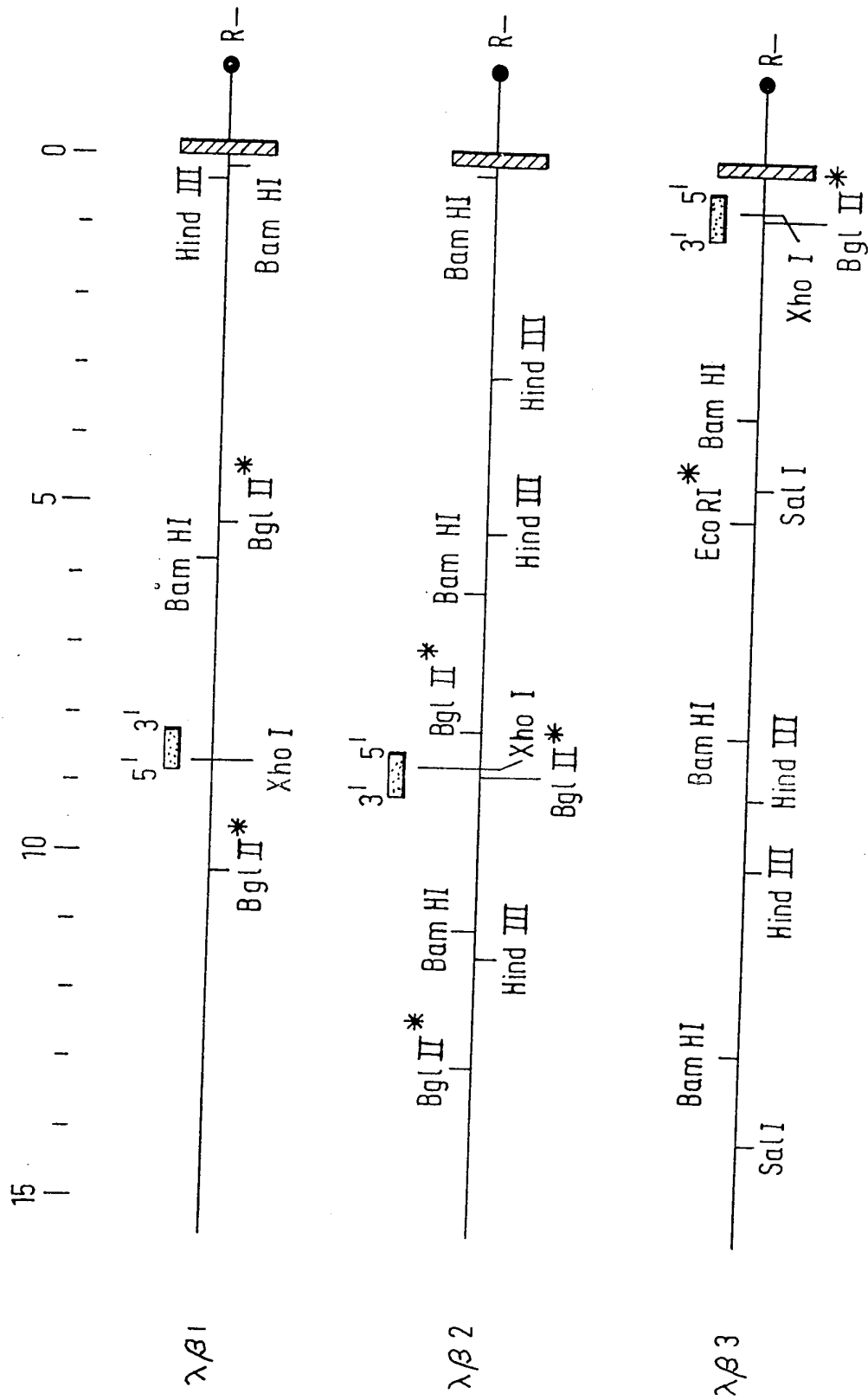
Obf. 4c



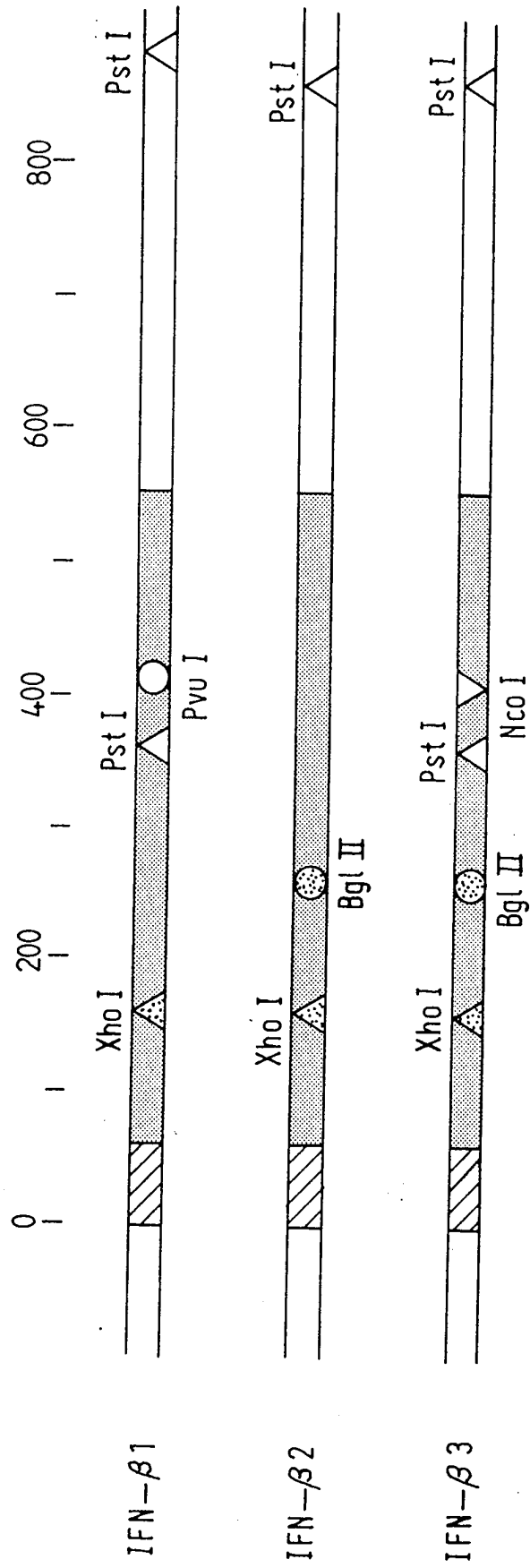
Obr.5



Obr. 6.



Obr. 7



Obr. 8

BoIFN-β1

AGTTTTAGAGGGCAACTAATAATTTAATGACATGGAAAAATGAAAGCGAGAACTGAAAGTGGGAAATTCCTCTGAAATA
GAAAGATGAGGGCCATGCTGTATAAGTAGCCCACTAAGGACGAGGACATTCCTCTGCAAACCTTGAAGACTCAGC

S1
TTCAGCACCTACTAGCAGAACAGGTAGCCCTGTGCCTGATTTTCATC met thr tyr arg cys leu leu gln
ATG ACC TAC CGG TGC CTC CTC CAG

S10 S20 1
met val leu leu leu cys phe ser thr thr ala leu ser arg ser tyr ser leu leu arg
ATG GTT CTC CTG CTG TGT TTC TCC ACC ACA GCT CTT TCC AGG AGC TAC AGC TTG CTT CGA

10 20
phe gln gln arg gln ser leu lys glu cys gln lys leu leu gly gln leu pro ser thr
TTC CAA CAA CGT CAG AGC CTT AAA GAG TGT CAG AAA CTC CTG GGG CAG TTA CCT TCA ACT

30 40
ser gln his cys leu glu ala arg met asp phe gln met pro glu glu met lys gln glu
TCT CAA CAT TGC CTC GAG GCC AGG ATG GAC TTC CAG ATG CCT GAG GAG ATG AAG CAA GAA

50 60
gln gln phe gln lys glu asp ala ile leu val met tyr glu val leu gln his ile phe
CAG CAG TTC CAG AAG GAA GAT GCC ATA TTG GTC ATG TAT GAG GTG CTC CAG CAC ATC TTC

70 80
gly ile leu thr arg asp phe ser ser thr gly trp ser glu thr ile ile glu asp leu
GGC ATT CTC ACC AGA GAC TTC TCC AGC ACT GGC TGG TCT GAG ACC ATC ATC GAG GAC CTC

90 100
leu lys glu leu tyr trp gln met asn arg leu gln pro ile gln lys glu ile met gln
CTT AAG GAA CTC TAT TGG CAG ATG AAT CGT CTG CAG CCA ATC CAG AAG GAA ATA ATG CAG

110 120
lys gln asn ser thr thr glu asp thr ile val pro his leu gly lys tyr tyr phe asn
AAG CAA AAC TCC ACT ACG GAA GAC ACG ATC GTT CCC CAC CTA GGG AAA TAT TAC TTC AAC

130 140
leu met gln tyr leu glu ser lys glu tyr asp arg cys ala trp thr val val gln val
CTC ATG CAG TAC CTG GAG TCC AAG GAG TAC GAC AGG TGT GCC TGG ACA GTC GTG CAA GTG

150 160 165
gln ile leu thr asn val ser phe leu met arg leu thr gly tyr val arg asp OP
CAA ATA CTC ACG AAC GTT TCT TTC CTG ATG AGA CTA ACA GGT TAC GTC CGT GAC TGA ACA

TCTCCACCTGTGGCTCTGGGAAGGGACAATGTGACTTTGAGGTGAGACTCTTCACCCAGCAGAGGCTCTTGAAGTAA

CTGACAATGCAATGCACTGGATTTCATGGACAGTTAAGACTAAGCTATTTTAAATTGATTTATGCATTATTTATTTA

TTTATTTAATGAGAAATAAATTATTTATCAAAATTTATTTAATGAGAAATAAATTATTTATGAAACAAAAGTCAACGT

GGCAGTTTCAATCTCAACTTGATTTATGTGACAACACATATTAATAAATTGCAGAGCACTTTGGAGACATTCATTGCAA

AACAAGCCTGCAGAGTAGTAGAGTTTCTGGCCCTGCCTTTGAGGCATTTAAATACAAGGAAGCTGTTTGAATGTCC

AAGTTATATGCATGCTCTCCATGT

Obr. 9a

BoIFN-82

TTT TAGCATTTAGCAATTCAC TGA AAAATTTACAAAAACATTAGAAATTTCTCCAGACTGTATATCTTTTCCCTTAAT
 ACATATAAAATCAAAAAGCAAGGAGCTAAAAAGAAAAGAGTTTTAGAGGTAAC TAATCAACACAGGAGAACTAAAAAG
 GAAACTGGAAAGTGGGAAATTCCTCTCCAATAGAAAGAATGGAGGGCCATGCTGTATAAGTAGCCACACTCAAGAAGG
 AAGGCCATTCACTCTGCAAACCTTGAAGACTCAGCTTCAGCACCTACTAGCAGAACAGGCAGCCCTGTGCCTGATTTTC

S1 S10
 met thr his arg cys leu leu gln met val leu leu leu cys phe ser thr thr ala
 ATC ATG ACC CAC CGG TGC CTC CTC CAG ATG GTT CTC CTG CTG TGT TTC TCC ACC ACA GCT

S20 1 10
 leu ser arg ser tyr ser leu leu arg phe gln gln arg arg ser leu glu leu cys gln
 CTT TCC AGG AGC TAC AGC TTG CTT CGA TTC CAA CAA AGG CGG AGC CTT GAG TTA TGT CAG

20 30
 lys leu leu arg gln leu pro ser thr pro gln his cys leu glu ala lys met asp phe
 AAA CTC CTG AGG CAG TTA CCT TCA ACT CCT CAA CAT TGC CTC GAG GCC AAG ATG GAC TTC

40 50
 arg met pro glu glu met lys gln ala gln gln phe arg lys glu asp ala ile leu val
 CGG ATG CCT GAG GAG ATG AAG CAA GCA CAG CAG TTC CGG AAG GAA GAT GCC ATA TTG GTC

60 70
 ile tyr glu met leu gln gln ile phe asn ile leu thr arg asp phe ser ser thr gly
 ATC TAT GAG ATG CTC CAG CAG ATC TTC AAT ATT CTC ACC AGA GAC TTC TCC AGC ACT GGC

80 90
 trp ser glu thr ile ile glu asp leu leu glu glu leu tyr glu gln met asn his leu
 TGG TCT GAG ACC ATC ATC GAG GAC CTC CTT GAG GAA CTC TAT GAG CAG ATG AAT CAT CTG

100 110
 glu pro ile gln lys glu ile met gln lys gln asn ser thr met gly asp thr thr val
 GAG CCA ATC CAG AAG GAA ATA ATG CAG AAG CAA AAC TCC ACT ATG GGA GAC ACA ACC GTT

120 130
 leu his leu arg lys tyr tyr phe asn leu val gln tyr leu lys ser lys glu tyr asn
 CTT CAC CTG AGG AAA TAT TAC TTC AAC CTC GTG CAG TAC CTA AAG TCC AAG GAG TAC AAC

140 150
 arg cys ala trp thr val val arg val gln ile leu arg asn phe ser phe leu thr arg
 AGG TGT GCC TGG ACA GTC GTG CGA GTG CAA ATA CTC AGG AAT TTT TCT TTC CTG ACG AGA

160 165
 leu thr gly tyr leu arg glu OP
 CTA ACA GGT TAC CTC CGT GAA TGA ACATCTCCACCTGTGGCTCTGGGATTGACAATGTGACTTTGAGGTGA

GACTCTTACCCAGTAGAGGCTCTTGAAGTAACTGACAATGCAATGCAATGGACAGTTAAATACTGTAAGCTATTTTTT

AAATTGATTATGCATTATTTATTTATTTAACTTTTATATGGGAAATAAATTATTTATGAAACAAAATTGAACATGG

CAGTTTTAATGTCAACTTGATTGATGTGACAACATATATTTAAAAATTGGCGAGCACCTGGAGACATTTATTGCAAAA

Obr. 9b

Обг. 9с

BoIFN-81
BoIFN-82
BoIFN-83
HuIFN-8

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

BoIFN-81
BoIFN-82
BoIFN-83
HuIFN-8

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

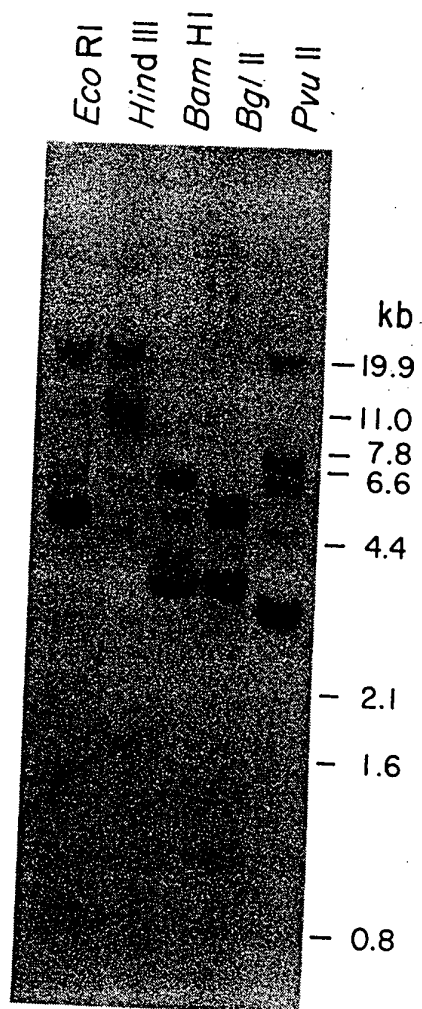
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

BoIFN-81
BoIFN-82
BoIFN-83
HuIFN-8

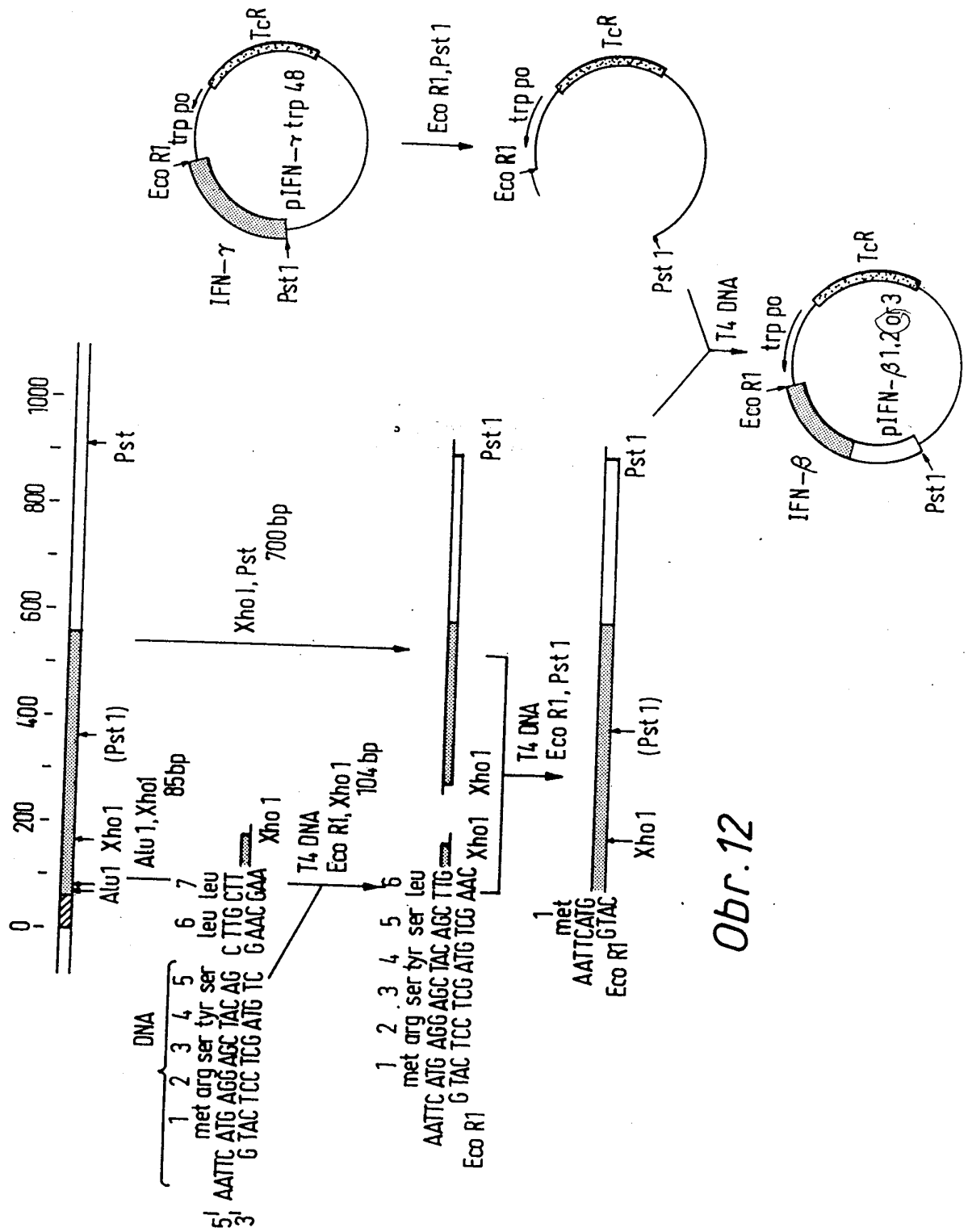
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

Obr. 10



Obr.11.



Obr. 12

S1	S10	S20	1	10	20	30
MKKY	Y I L A F Q L C I V L G S L G C Y	Y C Q D P Y V V K E S L E	E E S L E	N N Y F F N A S S	H S D V A D N G T	L F F L F L G I
MNAT	Y I L A L Q L F L M A V S G - C Y	Y C H G T V I E F F R E I E	E E S L E	N N Y F F N A S S	H S D V A D N G T	L F F L F L G I
MMKY	Y I L A L Q L L C G L L L C G F S G S	Y C G Q G Q G Q G Q G Q G Q G Q	Y C G Q G Q G Q G Q G Q G Q	N N Y F F N A S S	H S D V A D N G T	L F F L F L G I
MM	Y I L A L Q L L C G L L L C G F S G S	Y C G Q G Q G Q G Q G Q G Q	Y C G Q G Q G Q G Q G Q G Q	N N Y F F N A S S	H S D V A D N G T	L F F L F L G I

HuIFN- γ
MuIFN- γ
BoIFN- γ

[illegible]

HuIFN- γ
MuIFN- γ
BoIFN- γ

	100	110	120	130	140	146
K	K	K	K	K	K	K
R	R	R	R	R	R	R
K	K	K	K	K	K	K
K	K	K	K	K	K	K
L	L	L	L	L	L	L
E	E	E	E	E	E	E
D	D	D	D	D	D	D
D	D	D	D	D	D	D
F	F	F	F	F	F	F
M	M	M	M	M	M	M
S	S	S	S	S	S	S
I	I	I	I	I	I	I
A	A	A	A	A	A	A
K	K	K	K	K	K	K
L	L	L	L	L	L	L
T	T	T	T	T	T	T
N	N	N	N	N	N	N
P	P	P	P	P	P	P
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
I	I	I	I	I	I	I
V	V	V	V	V	V	V
V	V	V	V	V	V	V
D	D	D	D	D	D	D
L	L	L	L	L	L	L
Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
R	R	R	R	R	R	R
R	R	R	R	R	R	R
S	S	S	S	S	S	S
M	M	M	M	M	M	M
S	S	S	S	S	S	S
-	-	-	-	-	-	-

HuIFN- γ
MuIFN- γ
BoIFN- γ

Obr. 13