



URZĄD
PATENTOWY
PRL

Patent dodatkowy
do patentu nr ———

Int. Cl.⁴ C12N 15/00

Zgłoszono: 81 04 02 (P. 230484)

Pierwszeństwo: 80 04 03 dla zastrz. 2, 4
80 06 06 dla zastrz. 3, 7
Wielka Brytania

Zgłoszenie ogłoszono: 83 07 18

Opis patentowy opublikowano: 1990 05 31

Twórca wynalazku: ———

Uprawniony z patentu: Biogen N.V.,
Curacao (Antyle Holenderskie)

Sposób wytwarzania polipeptydu typu IFN- β

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania polipeptydu typu IFN- β podobnego do ludzkiego interferonu z fibroblastów.

W poniższej części opisu używa się nomenklatury interferonu opublikowanej w Nature, 286, 2421 (10 lipca 1980). Zastępuje ona nomenklaturę używaną we wcześniejszych opisach zgłoszeń patentowych, które stanowią dokumenty pierwszeństw dla niniejszego zgłoszenia.

I tak, np. IF oznacza się obecnie IFN, a interferon z fibroblastów jest obecnie oznaczany IFN- β .

Jak wiadomo, istnieją dwie klasy interferonów. Interferony klasy I mają małą cząsteczkę i są (gliko) proteinami stabilnymi w środowisku kwaśnym, nadającymi komórkom oporność na zakażenie wirusowe (A. Isaacs i J. Lindenmann, „Virus Interference I. The Interferon”, Proc. Royal Soc. Ser. B, **147**, 258 — 267 (1957) i W.E. Stewart, II, The Interferon System, Springer-Verlag (1979) (w poniższej części opisu „The Interferon System”). Interferony klasy II są labilne w środowisku kwaśnym. Są one, jak dotąd, słabo scharakteryzowane. Interferony, aczkolwiek są w pewnym stopniu komórkowo-swoiste (The Interferon System, str. 135—145), nie są jednak wirusowo — swoiste. Chronią one komórki przed wirusami w szerokim zakresie.

Ludzkie interferony („HuIFN”) zostały sklasyfikowane w trzech grupach: α , β i γ . HuIFN- β czyli interferon z fibroblastów tworzy się po odpowiedniej indukcji komórek fibroblastów ludzkich. Tworzy się on również, aczkolwiek w mniejszych ilościach, w komórkach limfoblastoidalnych, łącznie z większą ilością HuIFN- β . Tworzony przez te komórki IFN- β poddano ekstensywnemu oczyszczaniu i został on scharakteryzowany (E. Knight, jr., „Interferon: Purification And Initial Characterization From Human Diploid Cells”, Proc. Natl. Acad. Sci, USA, **73**,

520—523 /1976/). Jest on gliko-proteina o masie cząsteczkowej około 20 000 (M. Wiranowska-Stewart i wsp., „Contributions Of Carbohydrate Moieties To The Physical And Biological Properties Of Human Leukocyte, Lymphoblastoid And Fibroblast Interferons”, *Abst. Ann. Meeting Amer. Soc. Microbiol.*, str. 246 (1978). Jest on heterogenny pod względem wielkości cząsteczki, co prawdopodobnie powodują ugrupowania węglowodanowe cząsteczki.

Opublikowano również skład aminokwasowy naturalnego ludzkiego interferonu z fibroblastów (E. Knight, jr i wsp., „Human Fibroblast Interferon: Amino Acid Analysis And Amino-Terminal Amino Acid Sequence”, *Science*, **207**, 525—526 /1980/). Także, istnieje postęp w wyjaśnianiu sekwencji aminokwasów naturalnego ludzkiego interferonu z fibroblastów. Do chwili obecnej opublikowano sekwencję 13 aminokwasów końca NH_2 naturalnego dojrzałego białka: Met — Ser — Tyr — Asn — Leu — Leu — Gly — Phe — Leu — Gln — Arg — Ser — Ser... (E. Knight, jr i wsp., *supra*).

Doniesiono, że dwa różne geny, jeden zlokalizowany w chromosomie 2, a drugi w chromosomie 5, kodują IFN- β (D.L. Slate i F.H. Ruddle, „Fibroblast Interferon In Man Is Coded By Two Loci On Separate Chromosomes”, *Cell*, **16**, 171—180 /1979/). Tym niemniej, wyniki innych badań wskazują na to, że gen IFN- β jest zlokalizowany w chromosomie 9 (A. Medger i wsp., „Involvement Of A Gene On Chromosome 9 In Human Fibroblast Interferon Production”, *Nature*, **280**, 493—495 /1979/).

Chociaż naturalny HuIFN- β jest glikozylowany, usunięcie ugrupowania węglowodanowego (P.J. Bridgen i wsp., „Human Lymphoblastoid Interferon”, *J. Biol. Chem.*, **252**, 6585—6587, /1977/) lub synteza IFN- β w obecności inhibitorów, co oznacza wykluczenie glikozylacji (W.E. Stewart, II i wsp., „Effect of Glycosylation Inhibitors On The Production And Properties of Human Leukocyte Interferon”, *Virology*, **97**, 473—476 (1979), J. Fujisawa i wsp., „Nonglycosylated Mouse L Cell Interferon Produced By The Action Of Tunicamycin”, *J. Biol. Chem.*, **253**, 8677—8679 (1978), E.A. Havell i wsp., „Altered Molecular Species Of Human Interferon Produced In The Presence Of Inhibitors of Glycosylation”, *J. Biol. Chem.*, **252**, 4425—4427 (1977), *The Interferon System*, str. 181) daje cząsteczkę mniejszą od IFN- β . Zachowuje ona większość, lub całość, aktywności IFN- β .

HuIFN- β podobnie do wielu białek ludzkich, może być polimorficzny. Tak więc, komórki poszczególnych osobników mogą wytwarzać interferony należące ogólnie do klasy IFN- β , o podobnym działaniu fizjologicznym, lecz strukturalnie różniące się nieco od prototypu klasy, której są częścią. Aczkolwiek struktura białka IFN- β może być określona w stopniu wystarczającym, to jednak poszczególne osobniki mogą wytwarzać interferony nieco odmienne.

INF- β nie jest zazwyczaj wykrywalny w normalnych, czyli zdrowych komórkach (*The Interferon System*, str. 55—57). Białko to wytwarzane jest w wyniku zetknięcia się komórki z induktorem IFN. Induktorami interferonu są zwykle wirusy, lecz mogą być nimi także induktory o charakterze niewirusowym, takie jak naturalne lub syntetyczne dwuniciowe RFN, śródkomórkowe drobnoustroje, produkty bakteryjne i różne czynniki chemiczne. Wiele uwagi poświęcono postępom w badaniach tych niewirusowych induktorów nadających ludzkim komórkom oporność na zakażenie wirusowe (S. Baron i F. Dianzani, wyd., *Texas Reports On Biology And Medicine*, **35** („Texas Reports”), 528—540 /1977/). Prace te zostały uwieńczone niezbyt wielkim powodzeniem. Toteż, za korzystne uważa się obecnie użycie egzogenego HuIFN- β .

W leczeniu interferonem, skierowanym przeciw wirusom, nowotworom lub rakom, stosuje się różne reżimy dawkowania i różne drogi podawania (*The Interferon System*, str. 305—321). Np. interferon można skutecznie podawać doustnie, wprowadzać dożylnie, domięśniowo, donosowo, doskórnio i domięśniowo, oraz w postaci kropli do oczu, maści i do rozpylania. Zazwyczaj podaje się go 1—3 razy dziennie w dawkach 10^4 — 10^7 jednostek. Postęp leczenia zależy od pacjenta i jego stanu. Np. zakażenie wirusowe leczy się zwykle dawkami podawanymi 1 raz dziennie lub 2 razy dziennie w ciągu kilku dni do dwóch tygodni, a nowotwory lub raki leczy się zwykle dawkami podawanymi 1 raz dziennie lub kilka razy dziennie w ciągu kilku miesięcy lub lat. Najskuteczniejszy sposób leczenia musi, oczywiście, dla danego pacjenta określić opiekujący się nim lekarz, biorąc przy wyborze drogi podawania i reżimu dawkowania pod uwagę takie

dobrze znane czynniki, jak przebieg choroby, dotychczasowy sposób leczenia i odpowiedź pacjenta na interferon.

Jako czynnika przeciwwirusowego używano HuIFN do leczenia zakażeń dróg oddechowych (Texas Reports, str. 486—496), zapalenia rogówki spowodowanego wirusem opryszczki pospolitej (Texas Reports, str. 497—500, R. Sundmacher, „Exogenous Interferon in Eye Diseases”, International Virology IV, Haga, Abstract nr W 2/11, str. 99 /1978/), ostrego krwotocznego zapalenia spojówek (Texas Reports, str. 501—510), zapalenia rogówki i spojówki spowodowanego adenowirusem (A. Romano i wsp., ISM Memo I-A 8131 /październik 1979/), zakażeń spowodowanych przez wirus ospy wietrznej-półpaśca (Texas Reports, str. 511—515), cytomegalicznej choroby wtętovej (Texas Reports, str. 523—527) i zapalenia wątroby typu B (Texas Reports, str. 516—522). Patrz także The Interferon System, str. 307—319. Tym niemniej, użycie IFN jako czynnika przeciwwirusowego na dużą skalę wymaga większych ilości IFN, obecnie niedostępnych.

Oprócz działania przeciwwirusowego IFN wywiera również inne wpływy. Np. jest on antagonistą działania czynnika stymulującego rozwój kolonii, hamuje wzrost komórek krwiotwórczych tworzących kolonie i interferuje z normalnym różnicowaniem się prekursorów granulocytów i makrofagów (Texas Reports, str. 343—349). Hamuje również erytroblastyczne różnicowanie się komórek białaczki Frienda potraktowanych DMSO (Texas Reports, str. 420—428). Ważne jest to, że niektóre linie komórkowe mogą być znacznie bardziej wrażliwe pod tym względem na HuIFN- β niż na HuIFN- α (S. Einhorn i H. Strander, „Is Interferon Tissue-Specific 7 — Effect Of Human Leukocyte And Fibroblast Interferons On The Growth Of Lymphoblastoid And Osteosarcoma Cell Lines”, J.Gen. Virol., 35, 573—577 /1977/, T. Kuwata i wsp., „Comparison Of The Suppression Of Cell And Virus Growth In Transformed Human Cells By Leukocyte And Fibroblast Interferon”, J.Gen. Virol., 43, 435—439 /1979/).

IFN gra również rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej. Np., w zależności od dawki i czasu podania w stosunku do antygeny, IFN może być zarówno immunopotencjatorem, jak i immunosupresorem *in vivo* i *in vitro* (Texas Reports, str. 357—369). Poza tym, zaobserwowano, że swoiście uczulone limfocyty wytwarzają IFN po kontakcie z antygenem. Ten indukowany antygenem IFN może być regulatorem odpowiedzi immunologicznej, wpływając zarówno na poziom antygeny w krążeniu, jak i na ekspresję odporności komórkowej (Texas Reports, str. 370—374). Wiadomo również, że IFN zwiększa aktywność limfocytów zabijających i komórek wykazujących cytotoksyczność zależną od przeciwciał (R.R. Herberman i wsp., „Augmentation By Interferon Of Human Natural And Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity”, Nature, 277, str. 221—223 /1979/, P. Beverley i D. Knight, „Killing Comes Naturally”, Nature, 278, 119—120 /1979/, Texas Reports, str. 375—380, J.R. Huddleston i wsp., „Induction And Kinetics Of Natural Killer Cells in Humans Following Interferon Therapy”, Nature, 282, 417—419 /1979/, S. Einhorn i wsp., „Interferon And Spontaneous Cytotoxicity In Man. II. Studies In Patients Receiving Exogenous Leukocyte Interferon”, Acta Med. Scand. 204, 477—483 /1978/). Obydwa te rodzaje komórek są bezpośrednio lub pośrednio zaangażowane w ataku immunologicznym na komórki nowotworowe.

Tak więc, oprócz użyteczności jako czynnik przeciwwirusowy, HuIFN ma potencjalne zastosowanie lecznicze przeciw nowotworom i przeciw rakom (The Interferon System, 319—321 i 394—399). Wiadomo obecnie, że interferony wpływają na wzrost różnego rodzaju nowotworów u licznych zwierząt (The Interferon System, str. 292—304). Wydaje się że są one, podobnie do innych czynników przeciwnowotworowych, najbardziej skuteczne wobec małych nowotworów. Działanie przeciwnowotworowe ludzkiego IFN zależy od dawkowania i częstotliwości podawania, zawsze jednak jest wykazywane poniżej toksycznego poziomu interferonu. Zgodnie z tym były i są kontynuowane liczne badania właściwości przeciwnowotworowych i przeciwrakowych HuIFN i próby kliniczne. Należy do nich leczenie szeregu złośliwych chorób, takich jak mięsak kości, ostra białaczka szpikowa, szpiczak mnogi i choroba Hodgkina (Texas Reports, str. 429—435). Oprócz tego wykazano ostatnio, że HuIFN- β powoduje miejscową regresję nowotworów, kiedy wstrzyknie się go do podskórnych gruczołów, w których toczy się proces nowotwo-

rowy u pacjentów z czerniakiem i rakiem piersi (T. Nemoto i wsp., „Human Interferons And Intralesional Therapy Of Melanoma And Breast Carcinoma”, Amer. Assoc. For Cancer Research, Abs nr 993, str. 246 /1979/. Aczkolwiek wyniki badań klinicznych są zachęcające, przeszkodą w przeciwnowotworowym i przeciwrakowym zastosowaniu IFN- β jest często brak odpowiedniego zaopatrzenia w oczyszczony IFN- β .

Istotne jest, że niektóre linie komórkowe, odporne na wpływ IFN- α na komórki, pozostają wrażliwe na IFN- β . To zróżnicowanie efektu sugeruje, że IFN- β można użytecznie zastosować przeciw różnym rodzajom opornych komórek nowotworowych, pojawiających się pod wybiórczym naciskiem u pacjentów, którym podaje się wysokie dawki IFN- α (T. Kuwata i wsp., supra, A.A. Creasy i wsp., „The Role of G₀—G₁ Arrest In The Inhibition Of Tumor Cell Growth By Interferon”, Abstracts, Conference On Regulatory Functions Of Interferons, N.Y. Acad. Sci. nr 17 /23—26 października 1979/).

Na poziomie biochemicznym IFN indukują tworzenie co najmniej 3 białek: kinazy białkowej (B. Lebleu i wsp., „Interferon, Double-Stranded RFA And Protein Phosphorylation”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 3107—3111 /1976/, A.G. Hovanessian i I.M. Kerr, (The (2'—5') Oligoadenylate (ppp A2'—5A2'—5'A) Synthetase And Protein Kinase(s) From Interferon-Treated Cells”, Eur. J. Biochem., 93, 515—526 /1979/, polimerazy (2'—5')-oligo (A) (A.G. Hovanessian i wsp., „Synthesis Of Low-Molecular Weight Inhibitor Of Protein Synthesis With Enzyme From Interferon-Treated Cells”, Nature, 268, 537—539 /1977/, A.G. Hovanessian i I.M. Kerr, Eur. J. Biochem., supra) oraz fosfodiesterazy (A. Schmidt i wsp., „An Interferon-Induced Phosphodiesterase Degrading (2'—5') oligoizoadenylate And The C-C-A Terminus Of tRNA”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4788—4792 /1979/).

Okazuje się, że zarówno IFN- β jak i IFN- α są kluczowymi związkami w podobnych drogach metabolicznych (C. Baglioni, „Interferon-Induced Enzymatic Activities And Their Role In The Antiviral State”, Cell, 17, 255—264 /1979/ i jest możliwe, że oba mogą mieć wspólny aktywny rdzeń, gdyż oba rozpoznają receptor komórkowy kodowany przez chromosom 21 (M. Wiranowska-Stewart, „The Role Of Human Chromosome 21 In Sensitivity To Interferons”, J. Gen. Virol., 37, 629—634 /1977/). Obecność jednego, lub więcej, tych enzymów w komórkach potraktowanych IFN powinna pozwolić na dalszą charakterystykę białek o aktywności podobnej do aktywności IFN.

Obecnie HuIFN- β jest w ludzkich liniach komórkowych w hodowli komórkowej. Jest to kosztowny proces o niskiej wydajności. Jeden z większych producentów wytwarza tylko 40—50 $\times 10^8$ jednostek surowego IFN- β na rok (V.G. Edy i wsp., „Human Interferon: Large Scale Production In Embryo Fibroblast Cultures”, w Human Interferon (W.R. Stinebring i P.J. Chapple, wyd.), Plenum Publishing Corp., str. 55—60 /1978/). Po oczyszczeniu przez adsorpcję na kulkach szklanych o kontrolowanej wielkości porów, z surowych ekstraktów komórkowych można odzyskać z 50% wydajnością IFN- β o aktywności właściwej 10⁶ jednostek/mg (A. Billiau i wsp., „Human Fibroblast Interferon For Clinical Trials: Production, Partial Purification And Characterization”, Antimicrobial Agents And Chemotherapy, str. 49—55 /1979/). Dalszego oczyszczania do aktywności właściwej około 10⁹ jednostek/mg można dokonać z wydajnością około 100% za pomocą chromatografii powinowactwa wykorzystującej chelatowanie cynkiem (A. Billiau i wsp., „Production, Purification And Properties Of Human Fibroblast Interferon”, Abstracts, Conference On Regulatory Functions Of Interferons, N.Y. Acad. Sci., nr 29 (23—26 października, 1979). Ponieważ aktywność właściwa HuIFN- β jest tak wysoka, ilość IFN- β wymagana w handlowych zastosowaniach jest niska. Np. 100 g czystego IFN- β zapewniłoby od 3 milionów do 30 milionów dawek.

Ostatnie postępy w biologii molekularnej umożliwiają wprowadzanie do komórek bakteryjnych DNA kodującego specyficzne niebakteryjne białka eukariotyczne. Ogólnie, w przypadku DNA innego niż wytworzony na drodze syntezy chemicznej, konstrukcja cząsteczki takiego rekombinantowego DNA obejmuje następujące stadia: tworzenie jednoniciowej kopii DNA (cDNA) na matrycy oczyszczonego informacyjnego RNA (mRNA) dla pożądanego białka, konwersja cDNA do dwuniciowego DNA, włączenie DNA w odpowiednie miejsce odpowiedniego

nośnika klonującego z utworzeniem cząsteczki rekombinantowego DNA i transformacja odpowiedniej komórki-gospodarza odpowiednią rekombinantową cząsteczką DNA. Transformacja taka powinna pozwolić gospodarzowi na wytwarzanie żadanego białka. Z udziałem *E. coli* utrzymano kilka niebakteryjnych genów i białek przy zastosowaniu technologii rekombinantowego DNA. Należy do nich np. IFN- α (S. Nagata i wsp., „Synthesis In *E. coli* Of A Polypeptide With Human Leukocyte Interferon Activity”, *Nature*, **284**, 316—320 /1980/). Oprócz tego, technologię rekombinantowego DNA zastosowano do tworzenia plazmidu zawierającego, jak to można sądzić, sekwencję genową kodującą IFN- β (T. Taniguchi i wsp., „Construction And Identification Of A Bacterial Plasmid Containing The Human Fibroblast Interferon Gene Sequence”, *Proc. Japan Acad. Ser. B*, **55**, 464—469 /1979/).

Tym niemniej, żaden z poprzednich opisów nie podaje istotnej sekwencji genowej IFN- β i w żadnym nie porównano tej sekwencji z początkową sekwencją aminokwasów, czyli składem aminokwasowym naturalnego IFN- β . Poprzednia praca jest poświęcona tylko IFN- α , który należy do klasy I interferonów, różniący się od IFN- β chemicznie, biologicznie i immunologicznie (supra). Ostatnie doniesienie jest oparte wyłącznie na danych dotyczących hybrydyzacji. Dane takie nie są wystarczające do określenia, czy wyselekcjonowany klon zawiera całkowitą lub istotną sekwencję kodującą IFN- β albo czy klonowana sekwencja genowa będzie w komórce bakteryjnej zdolna do ekspresji IFN- β . Na podstawie hybrydyzacji można ustalić tylko to, że wprowadzony odcinek DNA jest w pewnym stopniu homologiczny i komplementarny z mRNA będącym składnikiem poli(A) RNA, który indukuje aktywność interferonu po wprowadzeniu do oocytów. Ponadto, stopień homologii jest zależny od warunków hybrydyzacji wybranych dla screeningu. Tak więc, na podstawie samej hybrydyzacji z mRNA będącym składnikiem poli(A) RNA nie można udowodnić, że wyselekcjonowana sekwencja DNA jest sekwencją kodującą HuIFN- β lub polipeptyd o immunologicznej i biologicznej aktywności HuIFN- β , albo, że ta sekwencja będzie użyteczna w wytwarzaniu tych polipeptydów przez odpowiednich gospodarzy.

Na seminarium w Zurychu 25 lutego 1980 r. Taniguchi stwierdził, że oznaczył on sekwencję w jednym ze swych zhybrydizowanych klonów. Doniósł także, że pierwszych 13 aminokwasów kodowanych przez tę sekwencję, były to takie same aminokwasy, jakie oznaczył Knight i wsp., supra, w przypadku naturalnego HuIFN- β . Taniguchi nie ujawnił pełnej sekwencji nukleotydowej swego klonu, ani nie porównał jej ze składem aminokwasowym dla naturalnego HuIFN- β . Później Taniguchi opublikował pełną sekwencję nukleotydową swego zhybrydizowanego klonu (T. Taniguchi i wsp., *Gene*, **10**, 11—15 /1980/). Sekwencja ta różni się jednym nukleotydem od opisanej i zastrzeżonej w brytyjskim zgłoszeniu patentowym nr 8 011 306, złożonym 3 kwietnia 1980, w stosunku do którego niniejszy opis zastrzega pierwszeństwo. Sekwencja aminokwasowa opublikowana przez Taniguchi jest identyczna z sekwencją opublikowaną i zastrzeżoną w powyższym zgłoszeniu patentowym. Taniguchi nie opublikował także do czasu złożenia brytyjskiego zgłoszenia patentowego nr 80.18701, zgłoszonego 6 czerwca 1980, w stosunku do którego niniejszy opis zastrzega pierwszeństwo, stwierdzenia, że w komórkach odpowiedniego gospodarza zachodzi ekspresja polipeptydu wykazującego immunologiczną lub biologiczną aktywność HuIFN- β . Taka ekspresja w komórkach gospodarza polipeptydu (polipeptydów) wykazującego (wykazujących) immunologiczną lub biologiczną aktywność HuIFN- β , oraz odpowiednie sposoby, polipeptydy, geny i rekombinantowe cząsteczki DNA, została stwierdzona w ramach pracy stanowiącej przedmiot niniejszego wynalazku.

Niniejszy opis nie jest wynikiem sugestii Research Disclosure nr 18309, str. 361—362 (1979) przygotowywania czystego lub zasadniczo czystego mRNA IFN- α przed próbą klonowania genu IFN lub wytwarzania polipeptydów podobnych do interferonu z fibroblastów w komórkach bakteryjnych gospodarzy.

W końcu, należy zauważyć, że wyselekcjonowanie sekwencji DNA, lub konstrukcja cząsteczki DNA, która hybryduje z mRNA z poli(A) RNA, który to mRNA doprowadza z oocytach do aktywności HuIFN, nie jest wystarczającym dowodem, że sekwencja DNA lub hybrydowy odcinek włączony do cząsteczki rekombinantowego DNA, odpowiada HuIFN. Natomiast, przy braku możliwości porównania sekwencji aminokwasowej kodowanej przez określoną sek-

wencję DNA i sekwencji aminokwasowej naturalnego białka, jedynie tworzenie polipeptydu wykazującego immunologiczną lub biologiczną aktywność HuIFN może istotnie dowieść, że wyselekcjonowana sekwencja DNA lub skonstruowana rekombinantowa cząsteczka DNA odpowiada HuIFN. Ważniejsze jest, że dopiero po wykazaniu tej aktywności HuIFN można użytecznie zastosować sekwencję DNA, rekombinantową cząsteczkę DNA lub pokrewne sekwencje do selekcji innych sekwencji odpowiadających HuIFN albo do tworzenia zrekombinowanych cząsteczek DNA zdolnych do ekspresji immunologicznej lub biologicznej aktywności HuIFN- β .

Na podstawie powyższej części opisu można ocenić, że problem wytwarzania HuIFN- β z użyciem techniki rekombinowanego DNA różni się od jakichkolwiek z opisanych powyżej sposobów. Tak więc, określona sekwencja DNA o nieznannej strukturze, kodująca z ekspresją HuIFN- β w komórkach odpowiedniego gospodarza, musi być, w celu użycia do wytwarzania HuIFN- β stwierdzona i wydzielona z bardzo złożonej mieszaniny sekwencji DNA. Dalej, problem zlokalizowania i wydzielenia jest utrudniony przez przewidywane bardzo niskie stężenie żądanej sekwencji DNA w złożonej mieszaninie i brak skutecznych środków do szybkiej analizy licznych sekwencji DNA mieszaniny w celu wyselekcjonowania i wydzielenia żądanej sekwencji.

Przez zastosowanie sposobu według wynalazku możliwe jest otrzymanie polipeptydu wykazującego immunologiczną lub biologiczną aktywność HuIFN- β w zastosowaniu przeciwwirusowym, przeciwnowotworowym lub przeciwrakowym, a także leczenie tych schorzeń. Sposób według wynalazku pozwala na wytwarzanie takich polipeptydów w ilościach i metodami dotychczas nieosiągalnymi.

Jak to wyjaśniono w poniższej części opisu, sekwencje DNA i zrekombinowane cząsteczki DNA, stosowane w sposobie według wynalazku, są zdolne do kierowania u odpowiedniego gospodarza wytwarzaniem polipeptydów wykazujących immunologiczną lub biologiczną aktywność HuIFN- β . Replikacja tych sekwencji i zrekombinowanych cząsteczek DNA u odpowiedniego gospodarza pozwala również na wytwarzanie większej ilości genów kodujących te polipeptydy. Molekularną strukturę i właściwości tych polipeptydów i genów można łatwo ustalić. Takie polipeptydy i geny są użyteczne, zarówno jako wytworzone przez organizm gospodarza jak i w postaci odpowiednich pochodnych lub modyfikacji, w kompozycjach oraz w metodach wykrywania i ulepszania procesu wytwarzania tych produktów, a także jako czynniki przeciwwirusowe, przeciwnowotworowe i przeciwrakowe.

Sposób wytwarzania polipeptydu typu IFN- β według wynalazku polega na hodowaniu organizmu gospodarza stransformowanego zrekombinowaną cząsteczką DNA zawierającą sekwencją DNA wybraną z następującej grupy:

a) inserty DNA w zrekombinowanych cząsteczkach G-pPLa-HFIF-67-12, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 i G-pPLc-HFIF-67-8, zawartych w mikroorganizmach, które zdeponowano pod numerami odpowiednio DSM 1851—1854,

b) inserty DNA w zrekombinowanych cząsteczkach G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 279T, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 218M1, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 i G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2, przy czym insert DNA G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 jest insertem zrekombinowanej cząsteczki zawartej w mikroorganizmie zdeponowanym pod numerem ATCC 31824.

c) insert DNA w zrekombinowanej cząsteczce p[325]-gHFIF-4, która zawarta jest w mikroorganizmie zdeponowanym pod numerem ATCC 31825,

d) sekwencje DNA, które hybrydują w 68°C i przy 0,3 M NaCl z insertami i sekwencjami określonymi w a), b) i c) i które kodują polipeptyd typu IFN- β i

e) sekwencje DNA, które są zdegenerowane w wyniku degeneracji kodu genetycznego i odpowiadają sekwencjom DNA i insertom określonym w a), b), c) i d) i które kodują polipeptyd typu IFN- β , przy czym wybrana sekwencja DNA jest związana z sekwencją kontrolującą ekspresję.

Korzystną sekwencję DNA wchodzącą w skład zrekombinowanej cząsteczki DNA stanowi jedna z następujących sekwencji określonych wzorami: ATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAA ATTGCTCTCCTGTTGTGCTTCTCCACTACAGCTCTTTCCATGAGCTAGAACTTGCTTG GATTCTACAAAGAAGCAGCAATTTTCAGTGTGAGCAAGCTCCTGTGGCAATTGAAT

GGGAGCCTTGAATACTGCCTCAAGCACAGGATGAACTTTGACATCCCTGAGGAGAT
 TAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGATTGACCATCTATGAGATGC
 TCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCATCTAGCACTGGCTGGAATGAGA
 CTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAACCATCTGAAGACAG
 TCCTGGAAGAAAACTGGAGAAAGAAGATTTACCAGGGGAAAACTCATGAGCAG
 TCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGAGT
 ACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTTACTTCA
 TTAACAGACTTACAGGTTACCTCCGAAAC IATGAGCTACAACCTTGCTTGGATTCTTA
 CAAAGAAGCAGCAATTTTCAGTGTGAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCT
 TGAATACTGCCTCAAGCACAGGATGAACTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCT
 GCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACA
 TCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCATCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTG
 AGAACCTCCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAACCATCTGAAGACAGTCTTGGGA
 AGAAAACTGGAGAAAGAAGATTTACCAGGGGAAAACTCATGAGCAGTCTGCAC
 CTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGAGTACAGTCA
 CTGTGCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTTACTTCATTAACA
 GACTTACAGGTTACCTCCGAAAC.

Natomiast jako sekwencję kontrolującą ekspresję korzystnie stosuje się sekwencję wybraną z grupy obejmującej system lac, system β -lac, system trp, regiony głównego operatora i promotora faga λ , region kontrolny fd otoczki białkowej i inne sekwencje, które kontrolują ekspresję genów w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych i ich wirusach.

Zrekombinowaną cząsteczkę DNA korzystnie stanowi cząsteczka wybrana z grupy obejmującej G-pPLa-HFIF-67-12, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 i G-pPLc-HFIF-67-8.

Korzystną jest także cząsteczka DNA wybrana z grupy obejmującej G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 279T, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 218Ml, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ Ml i G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2.

Jako korzystny drobnoustrój, który poddawany jest transformacji stosuje się drobnoustrój wybrany z grupy składającej się ze szczepów *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacilli*, drożdży, innych grzybów i komórek tkanek zwierzęcych, roślinnych i ludzkich.

Sposobem według wynalazku korzystnie wytwarza się polipeptyd typu IFN- β wybrany z grupy obejmującej polipeptydy o wzorze: MetThraAsnLysCysLeuLeuGlnIleAlaLeuLeuLeuCysPheSerThrThrAlaLeuSerMetSerTyrAsnLeuLeuGlyPheLeuGlnArgSerSerAsnPheGlnCysGlnLysLeuLeuTrpGlnLeuAsnGlyArgLeuGluTyrCysLeuLysAspArgMetAsnPheAspIleProGluGluIleLysGlnLeuGlnGlnPheGlnLysGluAspAlaAlaLeuThrIleTyrGluMetLeuGlnAsnIlePheAlaIlePheArgGlnAspSerSerSerThrGlyTrpAsnGluThrIleValGluAsnLeuLeuAlaAsnValTyrHisGlnIleAsnHisLeuLysThrValLeuGluGluLysLeuGluLysGluAspPheThrArgGlyLysLeuMetSerSerLeuHisLeuLysArgTyrTyrGlyArgIleLeuHisTyrLeuLysAlaLysGluTyrSerHisCysAlaTrpThrIleValArgValGluIleLeuArgAsnPheTyrPheIleAsnArgLeuThrGlyTyrLeuArgArg i MetSerTyrAsnLeuLeuGlyPheLeuGlnArgSerSerAsnPheGlnCysGlnLysLeuLeuTrpGlnLeuAsnGlyArgLeuGluTyrCysLeuLysAspArgMetAsnPhePheAspIleProGluGluIleLysGlnLeuGlnGlnGlnLysGluAspAlaAlaLeuThrIleTyrGluMetLeuGlnAsnIlePheAlaIlePheArgGlnAspSerSerSerThrGlyTrpAsnGluThrIleValGluAsnLeuLeuAlaAsnValTyrHisGlnIleAsnHisLeuLysThrValLeuGluGluLysLeuGluLysGluAspPheThrArgGlyLysLeuMetSerSerLeuHisLeuLysArgTyrTyrGlyArgIleLeuHisTyrLeuLysAlaLysGluTyrSerHisCysAlaTrpThrIleValArgValGluIleLeuArgAsnPheTyrPheIleAsnArgLeuThrGlyTyrLeuArgAsn.

Figura 1 na rysunku przedstawia schemat jednego z wariantów sposobu otrzymywania mieszaniny zrekombinowanych cząsteczek DNA, przy czym niektóre z nich są scharakteryzowane wprowadzonymi sekwencjami DNA kodującymi polipeptyd wytwarzany sposobem według wynalazku, figura 2 — schemat początkowego screeningu klonów, figura 3 — schemat jednego z zastosowań screeningu klonów z użyciem sekwencji DNA stosowanych w sposobie według wynalazku, figura 4 — kombinowaną sekwencję nukleotydów nici DNA kodującej HuIFN- β . Sekwencja jest numerowana od początku włączonego fragmentu do jego rejonu nie ulegającego translacji. Nukleotydy 65—127 reprezentują sekwencję sygnałową, a nukleotydy 128—625 reprezentują dojrzały interferon z fibroblastów. Sekwencja aminokwasowa polipeptydu sygnałowego

jest przedstawiona powyżej odpowiadającej jej sekwencji nukleotydowej, aminokwasy sygnałowego polipeptydu są numerowane od -21 do -1, a aminokwasy dojrzałego interferonu są numerowane od 1 do 166. Przegląd danych z analizy restrykcyjnej i fragmentów DNA HuIFN- β obecnego w hodowlach zdeponowanych w związku z brytyjskim zgłoszeniem patentowym nr 80.11306 złożonym dnia 3 kwietnia 1980 r. ujawnia w fig. 4 zmianę 2 nukleotydów w stosunku do fig. 4 powyższego brytyjskiego zgłoszenia patentowego. Zmiany te istnieją w sekwencji nie ulegającej translacji poprzedzającej proponowaną sygnałową sekwencję DNA HuIFN- β . Zmiany te nie wpływają na sekwencję DNA HuIFN- β lub sekwencję aminokwasową produktu po translacji oraz nie zmieniają możliwości użycia sekwencji jako sondy do hybrydyzacji w celu screeningu klonów w z włączonym DNA odpowiadającym HuIFN- β .

Fig. 5 przedstawia orientacyjną mapę restrykcyjną kilku plazmidów stosowanych w sposobie według wynalazku, fig. 6 stanowi porównanie składu aminokwasowego ludzkiego interferonu z fibroblastów otrzymanego zgodnie ze sposobem według wynalazku i naturalnego interferonu z fibroblastów, fig. 7 przedstawia mapę restrykcyjną genu HuIFN- β i sposób podziału na sekwencje pHFIF3, pHFIF6 i pHFIF7.

Fig. 8 przedstawia schemat konstrukcji cząsteczki zrekombinowanego plazmidu DNA pPLa-HFIF-67-1, stosowanego w sposobie według wynalazku, fig. 9 przedstawia schemat konstrukcji cząsteczki zrekombinowanego plazmidu DNA pPLa-HFIF-67-12 i pPLa-HFIF-67-12 Δ 19, stosowanego w sposobie według wynalazku, fig. 10 przedstawia schemat konstrukcji cząsteczki zrekombinowanej DNA pPLc-HFIF-67-8 stosowanej w sposobie według wynalazku, fig. 11 przedstawia schematyczną częściową mapę restrykcyjną pPLa-HFIF-67-12 otrzymanego sposobem według wynalazku, fig. 12 przedstawia orientacyjną częściową mapę restrykcyjną pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 otrzymanego sposobem według wynalazku, fig. 13 przedstawia orientacyjną częściową mapę restrykcyjną pPLc-HFIF-67-8 otrzymanego sposobem według wynalazku.

W celu pełniejszego zrozumienia sposobu według wynalazku zamieszczono następujący szczegółowy opis.

W niniejszym opisie stosuje się następujące terminy: Nukleotyd. Monomeryczna jednostka DNA lub RNA składająca się z ugrupowania cukru (pentoza), fosforanu i azotowej zasady heterocyklicznej. Zasada jest połączona z ugrupowaniem cukru węglem glikozydowym (węgiel pentozy 1') i taka kombinacja zasady i cukru zwana jest nukleozydem. Zasada charakteryzuje nukleozyd. Czterema zasadami DNA są: adenina (A), guanina (G), cytozyna (C) i tymina (T). Czterema zasadami RNA są: A, G, C i uracyl (U).

Sekwencja DNA. Liniowo ułożone nukleotydy połączone ze sobą wiązaniami fosfodwues-trowymi między węglami 3' i 5' sąsiadujących pentoz.

Kodon. Sekwencja DNA składająca się z 3 nukleotydów (tryplet), która za pośrednictwem mRNA koduje aminokwas, sygnał startu translacji i sygnał zakończenia (stop) translacji. Np tryplety nukleotydów TTA, TTG, CTT, CTC, CTA i CTG kodują aminokwas leucynę (Leu), TAG, TAA i TGA są translacyjnymi sygnałami stop, a ATG jest translacyjnym sygnałem start.

Faza odczytywania. Sposób grupowania kodonów w sekwencje aminokwasowe podczas translacji mRNA. Podczas translacji musi być zachowana prawidłowa faza odczytywania. Np. sekwencja DNA GCTGGTTGTAAG może ulegać ekspresji w trzech fazach odczytywania, przy czym każda z nich daje inną sekwencję aminokwasową: GCT GGT TGT AAG — — Ala — Gly — Cys — Lys; G CTG GTT GTA Ag — — Leu — Val — Val; GC TGG TTG TAA G — — Trp — Leu — (STOP).

Polipeptyd. Liniowo ułożone aminokwasy połączone ze sobą wiązaniem peptydowym między grupą α -aminową a grupą karboksylową sąsiadującego aminokwasu.

Genom. Całkowity DNA komórki lub wirusa. Należą do niego przede wszystkim geny strukturalne, kodujące polipeptydy, jak również operator, promotor, sekwencje przyłączające rybosomy i sekwencje wzajemnie na siebie oddziaływujące, w tym takie jak sekwencje Shine-Dalgarno.

Gen strukturalny. Sekwencja DNA kodująca za pośrednictwem własnego matrycowego czyli messenger RNA (mRNA) sekwencję aminokwasową charakterystyczną dla określonego polipeptydu.

Transkrypcja. Proces tworzenia mRNA na podstawie genu strukturalnego.

Translacja. Proces tworzenia polipeptydu na podstawie mRNA.

Ekspresja. Proces kierowany przez gen strukturalny z wytworzeniem polipeptydu. Stanowi on połączenie transkrypcji i translacji.

Plazmid. Niechromosomalna dwuniciowa sekwencja DNA zawierająca nie naruszony replikon tak, że plazmid replikuje się w komórce gospodarza. Gdy plazmid znajdzie się w organizmie jednokomórkowym, cechy charakterystyczne tego organizmu mogą ulec zmianie lub transformacji w wyniku obecności DNA plazmidu. Np. plazmid zawierający gen oporności na tetracyklinę (Tet^R) transformuje komórkę uprzednio wrażliwą na tetracyklinę w komórkę oporną. Komórkę transformowaną przez plazmid nazywa się transformantem.

Fag lub bakteriofag. Wirus bakteryjny. Wiele z tych wirusów składa się z sekwencji DNA zamkniętych w białkowej osłonce lub otoczce (kapsyd).

Nośnik klonujący. Plazmid, DNA faga albo inna sekwencja DNA zdolna do replikacji w komórce gospodarza, charakteryzująca się jednym, lub niewielką ilością miejsc rozpoznawania endonukleaz restrykcyjnych, w których sekwencje DNA można przeciąć w określony sposób bez towarzyszącej temu utraty zasadniczej biologicznej funkcji DNA, np. zdolności do replikacji, tworzenia białek osłonki, jak również bez utraty promotora lub miejsc wiążących. Nośnik klonujący zawiera marker nadający się do użycia przy identyfikacji transformowanych komórek np. na oporność na tetracyklinę lub ampicylinę. Nośnik klonujący jest często nazywany wektorem.

Klonowanie. Proces otrzymywania populacji organizmów lub sekwencji DNA wyodrębnionych z jednego z takich organizmów lub sekwencji na drodze reprodukcji aseksualnej.

Rekombinantowa cząsteczka DNA lub hybrydowy DNA. Cząsteczka DNA zawierająca fragmenty DNA z różnych genomów połączone koniec-do-konca poza żywymi komórkami. Cząsteczka taka wykazuje zdolność zakażania komórek pewnych gospodarzy i utrzymywania się w nich.

Sekwencja kontrolująca ekspresję. Sekwencja nukleotydów kontrolująca i regulująca ekspresję genów strukturalnych, gdy połączona jest z tymi genami operatywnie. Należy tutaj układać, większe operatorowe i promotorowe regiony faga λ , region kontrolny białka fd osłonki i inne sekwencje, o których wiadomo, że kontrolują ekspresję genów komórek prokariotycznych lub eukariotycznych oraz ich wirusów.

Na figurze 1 przedstawiony jest schemat jednego z wariantów sposobu według wynalazku otrzymywania mieszanin rekombinantowych cząsteczek DNA, przy czym niektóre z nich zawierają włączone sekwencje DNA, co stanowi cechę charakterystyczną wynalazku.

Otrzymywanie poli(A)RNA zawierającego mRNA ludzkiego interferonu z fibroblastów (mRNA IFN- β).

RNA stosowany w sposobie według wynalazku ekstrahuje się z ludzkich komórek VGS, diploidalnej linii komórkowej fibroblastów, którą można kultywować w jednowarstwowych hodowlach w temperaturze 37°C. IFN- β tworzony jest w tych komórkach po indukcji poli(I,C) w obecności cykloheksimidu.

W przypadku typowego sposobu izolowania RNA, hodowlę w każdej z 20 obracanych butli z diploidalnymi komórkami VGS w ciągłej pojedynczej warstwie primuje się przez noc za pomocą IFN- β w stężeniu 100 jednostek/ml, a następnie indukuje w ciągu 1 godziny za pomocą poli(I,C) w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$ w obecności cykloheksimidu w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$. Po inkubacji w obecności cykloheksimidu w stężeniu 50 $\mu\text{g/ml}$ prowadzonej przez 4 godziny, komórki zbiera się przez zeskrobanie do buforowanego fosforanami roztworu soli i odwirowuje. Komórki poddaje się lizie w ciągu 15 minut w temperaturze 0°C, w celu usunięcia nie naruszonych jąder komórkowych zawierających DNA oraz w celu wyizolowania cytoplazmatycznego RNA, przez zanurzenie ich w hipotonicznym buforze /10 mM Tris-HCl (pH 7,4)/, 10 mM NaCl i 1,5 mM MgCl_2 i dodanie NP 40 do stężenia 1%. Jądra usuwa się przez osadzenie ich za pomocą odwirowania w wirniku Sorvall SS-34 w ciągu 5 minut przy 3000 obr/min. Do supernatantu dodaje się siarczan sodowo-dodecylowy (SDS) i EDTA do stężenia, odpowiednio, 1% i 10 mM, a następnie ekstrahuje się 5 razy dwiema objętościami mieszaniny zawierającej w stosunku 1:1 redestylowany fenol

i mieszaninę chloroformu z alkoholem izoamylowym (25:1). Fazy wodne zawierające RNA oddziela się przez odwirowanie z użyciem wirnika Sorvall SS-34 przy 8 000 obr/min w ciągu 10 minut po każdej ekstrakcji. RNA wytrąca się z fazy wodnej przez dodanie 2 M octanu sodowego o pH 5,1 (1/10 objętości) i etanolu (2,5 objętości). Otrzymuje się zazwyczaj 60—90 g całkowitego cytoplazmatycznego RNA na 1 obracaną butlę.

Używa się również innych sposobów ekstrahowania cytoplazmatycznego RNA. Np. komórki ulegają całkowitej lizie po homogenizacji w 0,2 M Tris-HCl o pH 9,0, 50 mM NaCl, 20 mM EDTA i 0,5% SDS. Ekstrahuje się je mieszaniną fenolu i chloroformu jak wyżej (F.H. Reynolds i wsp., „Interferon Activity Produced By Translation Of Human Interferon Messenger RNA In Cell — Free Ribosomal Systems And In *Xenopus* Oocytes”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 4881—4887 (1975)). W inny sposób przemyte komórki zawieszają się w 400 μ l 0,1 M NaCl, 0,01 M Tris — HCl o pH 7,5 i 0,001 M EDTA (bufor NTE) i dodaje się 2,5 ml 4 M izocyjanianu guanidyniowego i 1 ml β -merkaptoetanolu w 20 mM octanie sodowym (pH 5,0), a następnie komórki homogenizuje się. Lizat nawarstwia się na 1,3 ml 5,7 M CsCl w probówce nitrocelulozowej Beckman SW-60 Ti, wiruje w ciągu 17 godzin przy 39 000 obr/min do osadzenia RNA i oddzielenia go od DNA, białka i lipidów. Następnie RNA ekstrahuje się 1 raz mieszaniną fenolu i chloroformu (J. Morser i wsp., „Characterization Of Interferon Messenger RNA From Human Lymphoblastoid Cells”, *J. Gen. Virol.*, **44**, 231—234 /1979/).

Całkowity RNA bada się pod względem obecności mRNA IFN- β przez wstrzyknięcie do cytoplazmy oocytów *Xenopus laevis* i oznaczenie indukowanej w nich aktywności IFN- β (Reynold i wsp., supra). Badania te prowadzi się rozpuszczając RNA w wodzie i wstrzykując około 50 μ l do każdego oocytu. Następnie oocyty inkubuje się przez noc w temperaturze pokojowej w podłożu Bartha (J. Gurdon, *J. Embryol. Exper. Morphol.*, **20**, 401—414 /1968/), homogenizuje w części podłoża i usuwa debris przez odwirowanie oraz bada aktywność IFN- β w supernatancie. Wykrycia aktywności IFN- β dokonuje się za pomocą oceny zmniejszenia cytopatycznego wpływu wirusa (W.E. Stewart i S.E. Sulkin, „Interferon Production In Hamsters Experimentally Infected With Rabies Virus”, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **123**, 650—653 /1966/). Stosowanym tu wirusem jest wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (szczep Indiana), a komórkami ludzkie diploidalne fibroblasty trisomiczne w odniesieniu do chromosomu 21 dla zapewnienia wyższej wrażliwości na IFN- β . Aktywność IFN- β określa się w odniesieniu do wzorca porównawczego IFN 69/19.

Poli(A) RNA zawierający mRNA IFN- β izoluje się z cytoplazmatycznego RNA przez adsorpcję na oligo(dT)-celulozie (typ 7, P-L Biochemicals) w 0,4 M NaCl, 10 mM Tris — HCl, o pH 7,8, 10 mM EDTA i 0,2% SDS w ciągu 10 minut w temperaturze pokojowej. Agregację RNA zmniejsza się do minimum przez ogrzewanie RNA przed adsorpcją w ciągu 2 minut w temperaturze 70°C. Po przemyciu celulozy wyżej wspomnianym buforem, frakcję poli(A) RNA eluuje się 10 mM Tris-HCl o pH 7,8, 1 mM EDTA i 0,2% SDS. Zazwyczaj zawiera ona 4—5% całkowitego RNA, jak można sądzić na podstawie pomiarów gęstości optycznej przy 260 nm.

Dalsze oczyszczanie w celu wzbogacenia poli(A) RNA w mRNA IFN- β prowadzi się w gradientach formamid-sacharozy (T. Pawson i wsp., „The Size of Rous Sarcoma Virus mRNAs Active In Cell-Free Translation”, *Nature*, **268**, 416—420 /1977/). Gradienty te wykazują znacznie większą zdolność rozdzielczą niż niedenaturujące gradienty sacharozy. Zazwyczaj około 80 μ g poli(A) RNA rozpuszcza się w 50% formamidzie, 100 mM LiCl, 5 mM EDTA, 0,2% SDS i 10 mM Tris-HCl o pH 7,4, ogrzewa się w temperaturze 37°C w ciągu 2 minut w celu zapobieżenia agregacji i nanosi na 5—20% gradient sacharozy w poliallomerowej próbówce Beckman SW-60 Ti. Po wirowaniu w temperaturze 20°C w ciągu 4 1/2 godziny przy 60 000 obr/min w wirniku Beckman SW-60 Ti z całkowicie wyznakowanym 14 C sukariotycznym RNA służącym jako marker wielkości, frakcjonuje się gradient i oznacza gęstość optyczną frakcji. Wszystkie frakcje RNA wytrąca się dwukrotnie za pomocą 0,5 M NaCl i 2,5 objętości etanolu i bada aktywność mRNA interferonu jak wyżej opisano. W rezultacie tych procesów oczyszczania otrzymuje się około 40-krotne wzbogacenie poli(A) RNA w mRNA IFN- β .

Alternatywnie, 60 μg mRNA adsorbowanego na oligo(dT) frakcjonuje się za pomocą elektroforezy w 4% żelu poliakrylamidowym w 7 M moczniku, 0,1% SDS, 50 mM buforze Tris-boran o pH 8,3 i 1 mM EDTA, przy czym mRNA rozpuszcza się w tym buforze i ogrzewa w temperaturze 55°C w ciągu 1 minuty przed naniesieniem na żel. Po elektroforezie tnije się żel na 2 mm kawałki i eluuje RNA z każdego zhomogenizowanego kawałka żelu. Następnie oczyszcza się RNA od zanieczyszczeń przez adsorpcję na oligo(dT)-celulozie i bada się obecność mRNA-IFN- β jak wyżej opisano.

W tym punkcie należy rozumieć, że zarówno poli(A) RNA, jako produkt otrzymany po rozdziale w gradientach formamid-sacharoza, jak i po frakcjonowaniu w żelu poliakrylamidowym, zawiera bardzo wiele różnych rodzajów mRNA. Oprócz mRNA specyficznego dla IFN- β , występują również inne mRNA jako niepożądane zanieczyszczenia (figura 1). Niestety, RNA stanowiące zanieczyszczenia zachowują się bardzo podobnie do mRNA HuIFN- β w pozostałych etapach procesu klonowania prowadzonego sposobem według wynalazku. Tak więc, ich obecność w poli(A) RNA spowoduje w końcowym etapie otrzymanie dużej ilości niepożądanych klonów bakteryjnych zawierających geny kodujące polipeptydy inne niż IFN- β . Te zanieczyszczenia powodują powstanie złożonego problemu screeningu przy izolowaniu pożądaných klonów hybrydowych IFN- β . W przypadku IFN- β problem screeningu jest poza tym utrudniony przez brak wystarczająco oczyszczonej próbki mRNA HuIFN- β lub DNA, albo jego fragmentu, jako próbki do screeningu w celu identyfikacji pożądaných klonów. Tak więc proces screeningu klonów IFN- β jest bardzo czasochłonny i trudny. Dalej, ponieważ można oczekiwać, że tylko bardzo mały procent klonów IFN- β będzie zdolny do ekspresji z wykazaniem aktywności biologicznej lub immunologicznej, izolowanie aktywných klonów jest procesem screeningowym przypominającym „szukanie igły w stogu siana”.

Korzystnie można użyć technologii rekombinantowego RNA do zapewnienia oczyszczonej próbki mRNA HuIFN- β lub cDNA, lub jego fragmentu. Tego oczyszczonego mRNA lub cDNA można następnie użyć do szybkiego screeningu bardzo dużej ilości klonów bakteryjnych, a przez to znacznie zwiększyć prawdopodobieństwo izolowania klonów zdolnych do ekspresji IFN- β w postaci czynnej.

Synteza dwuniciowego cDNA zawierającego cDNA IFN- β

Poli(A) RNA wzbogaconego w mRNA IFN- β używa się jako matrycy do przygotowania komplementarnego DNA (cDNA) zasadniczo jak opisał R. Devos i wsp. „Construction And Characterization Of A Plasmid Containing A Nearly Full-Size DNA Copy Of Bacteriophage MS2 RNA”, *J. Mol. Biol.*, **128**, 595—619 (1979) w celu skonstruowania plazmidu zawierającego kopię DNA bakteriofaga MS2 RNA.

Jednociowy cDNA przygotowuje się wykorzystując poli(A) RNA za pomocą polimerazy DNA zależnej od RNA (25 jednostek) z wirusa ptasiej białaczki mieloblastycznej (AMV) oraz odwrotnej transkryptazy (otrzymanej od Dr J. Bearda, Life Sciences, Gulfport, Florida). Reakcję inicjuje się za pomocą 6 μg primera (dT)₁₀ (Miles) zhybrydowanego z końcem poli(A) RNA, w 50 μl 50 mM Tris-HCl o pH 8,3; 10 M MgCl₂, 30 mM β -merkaptetanolu, 4 mM Na₄P₂O₇, 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ inaktywowanej bydlęcej albuminy surowiczej, dTTP, dATP, dCTP i dGTP (każdy w stężeniu 0,5 mM) i α -³²P-dATP (20 μCi , Amersham). Po 30 minutach prowadzenia reakcji w temperaturze 41°C, reakcję kończy się przez dodanie EDTA do 10 mM. Mieszaninę reakcyjną ekstrahuje się równą ilością mieszaniny fenol: chloroform: alkohol izoamylowy 25:24:1 i fazę wodną nawarstwia się na kolumnę Sephadex G 50, po czym przeprowadza się elucję buforem TE (10 mM Tris — HCl o pH 7,5 i 1 mM EDTA). Frakcję zerową, wykazującą radioaktywność wytrąca się przez dodanie 10 μg przenoszącego RNA (tRNA) E.coli, octanu potasu o pH 5,1 do stężenia 0,2 M i 2,5 objętości etanolu.

Populacja cząsteczek cDNA syntetyzowanych w powyższy sposób stanowi w rzeczywistości złożoną mieszaninę cDNA pochodzących od różnych mRNA obecnych w poli(A) wzbogaconym w mRNA (fig. 1). Oprócz tego, z powodu przedwczesnego zakończenia reakcji przez odwrotną transkryptazę AMV, wiele rodzajów cDNA istnieje w postaci niecałkowitych kopii różnych mRNA w poli(A) RNA (nie uwidoczniło tego na fig. 1).

Przed otrzymaniem cDNA w postaci dwuniciowej uwalnia się cDNA z połączenia z komplementarną matrycą RNA przez wytrącenie etanolem i inkubację w buforze TEC (10 mM Tris — HCl o pH 7,5 i 1 mM EDTA) z rybonukleazą T₁ (10 jednostek, Sankyo Co., Ltd) i trzustkową rybonukleazą A (10 µg, Sigma) w objętości 10 µl w ciągu 30 minut w temperaturze 37°C, przy czym rybonukleazy są wolne od endo- i egzodezoksyrybonukleaz specyficznych dla pojedynczej nici. Usunięcie nici matrycowej rybonukleazą zamiast alkalią zapobiega możliwej mutacji cDNA przez dezaminację katalizowaną zasadą.

cDNA można otrzymać w postaci dwuniciowej za pomocą polimerazy DNA I (A. Efstradiadis i wsp., „Enzymatic in Vitro Synthesis Of Globin Genes”, Cell, 7, 279—288 /1976/). 10 µl mieszaniny rybonukleazy (cDNA otrzymanej w sposób opisany powyżej rozcieńcza się do objętości 20 µl za pomocą MgCl₂ do stężenia 10 mM, DTT do stężenia 10 mM, fosforanu potasowego (pH 6,9) do stężenia 100 mM, dATP, dCTP, dTTP, dGTP, każdy do stężenia 0,3 mM α-³²P-dATP (20 µCi, Amersham) i polimerazy DNA (40 jednostki Biolabs). Po upływie 6 godzin w temperaturze 15°C dodaje się EDTA do stężenia 10 mM i SDS do stężenia 0,1% i izoluje dwuniciowy cDNA przez ekstrakcję mieszaniną fenol: chloroform: alkohol izoamylowy, chromatografię na Sephadex G50 i wytrącenie frakcji zerowej jak wyżej opisano.

W celu otwarcia jednoniciowej pętli przypominającej szpilkę do włosów, pozostającej w dwuniciowym cDNA, wytrącony cDNA rozpuszcza się w 100 µl 0,2 M NaCl, 50 mM octanie sodowym o pH 4,5, 10 mM octanie cynku i 2 µg zinaktywowanego ciepłym DNA z grasicy cielęcej i poddaje reakcji z udziałem nukleazy S 1 (5 jednostek, Sigma) w ciągu 30 minut w temperaturze 37°C. Dodanie EDTA do stężenia 10 mM, ekstrakcja mieszaniną fenol: chloroform: alkohol izoamylowy i wytrącenie z fazy wodnej dodatkiem 10 µg tRNA E.coli jako nośnika, 0,2 M octanu sodowego o pH 5,1 i 2,5 objętości etanolu, pozwala uzyskać mieszaninę dwuniciowego DNA z wolnymi końcami. Mieszanina ta jest heterogenna zarówno w wyniku heterogenności poli(A) RNA użytego jako matryca do przygotowywania cDNA (fig. 1) jak i z powodu przedwczesnego zakończenia reakcji tworzenia transkryptu cDNA przez odwrotną transkryptazę AMV (nie uwidocznilo tego na fig. 1).

W celu określenia wpływu tego ostatniego rodzaju heterogenności oznacza się wielkość cząsteczki cDNA za pomocą elektroforezy w 4% żelu poliakryloamidowym, w 50 mM buforze Tris-boran o pH 8,3 i 1 mM EDTA, przy 5'-³²P-znakowanych fragmentach restrykcyjnych (OX174 (RF)-DNA) służących jako markery wielkości cząsteczki. Wybiera się pasma DNA o odpowiedniej wielkości cząsteczki. Wybiera się pasma DNA o odpowiedniej wielkości cząsteczki (np. wielkości klasy 800—900 par zasad (bp), 700—800 bp, 650—700 bp i 550—650 bp). Ponieważ dwuniciowy cDNA przygotowywany za pomocą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym poli(A) RNA wykazuje wyróżniające się pasma o około 850 bp, uważa się to pasmo za reprezentujące cDNA o pełnej długości. Pasma eluuje się przez rozgniecenie żelu w 0,5 M octanie amonowym i 0,1% SDS i mieszanie przez noc. Po usunięciu debris za pomocą odwirowania, DNA adsorbuje się na sproszkowanym hydroksyapatycie, nanosi na kolumnę Sephadex G 50 w 5 mM fosforanie sodowym o pH 7,5 przemywa ekstensywnie buforem, eluuje 0,45 M fosforanem sodowym o pH 7,5 i bezpośrednio odsala wykorzystując efekt sitowy Sephadex G 50. Frakcje zawierające wyeluowany DNA, co stwierdza się na podstawie radioaktywności ³²P wytrąca się przez dodanie 10 µg tRNA E.coli, octanu sodowego do stężenia 0,2 M i 2,5 objętości etanolu.

Efektywność powyżej opisanego sposobu otrzymywania cDNA można przedstawić na przykładzie typowego eksperymentu, w którym około 2 µg poli(A) RNA po rozdziale w gradiencie formamid — sacharoza daje 16 ng dwuniciowego cDNA o wielkości cząsteczki w zakresie 800—900 bp. Należy zauważyć, że ten dwuniciowy cDNA jest mieszaniną wielu różnych cDNA, z których bardzo nieliczne są to cDNA IFN-β (figura 1).

Do klonowania dwuniciowego cDNA, otrzymanego sposobem według wynalazku, można użyć wielu różnorodnych kombinacji gospodarz/nośnik klonujący. I tak np. użyteczne nośniki klonujące mogą składać się z fragmentów chromosomalnych, niechromosomalnych i syntetycznych sekwencji DNA, sekwencji takich jak znane pochodne SV 40 i znane plazmidy bakteryjne, np. plazmidy E.coli, takie jak col E1, pCR1, pBR322, pMB9 i ich pochodne, plazmidy odnoszące

się do szerszego zakresu gospodarzy, np. RP4, fagowe DNA, np. liczne pochodne faga λ , np. NM 989 i inne fagi DNA, np. M13 i jednoniciowe fagi DNA Filamentous oraz wektory otrzymane przez łączenie DNA plazmidowych i fagowych, takie jak plazmidy, które zostały zmodyfikowane w celu zastosowania fagowego DNA lub innych sekwencji kontrolujących ekspresję, względnie plazmidy drożdży, takie jak plazmid 2 μ albo jego pochodne. Do użytecznych gospodarzy mogą należeć bakterie — gospodarze, takie jak *E. coli* HB 101, *E. coli* X1776, *E. coli* X2282, *E. coli* MRCI i szczepy *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* i inne laseczki, drożdże oraz inne grzyby, zwierzęta — gospodarze i rośliny — gospodarze, takie jak zwierzęce, ludzkie lub roślinne komórki w hodowli, względnie inni gospodarze. Oczywiście nie wszystkie kombinacje gospodarz/wektor mogą być równie korzystne. Znaczący mogą wybrać określoną kombinację gospodarz/nośnik klonujący po uwzględnieniu zasad wynalazku bez odchodzenia od zakresu niniejszego wynalazku.

Następnie, w każdym specyficznym nośniku klonującym można wybrać różne miejsca do insercji dwuniciowego DNA. Miejsca te zwykle są wyznaczone przez endonukleazę restrykcyjną, która je przecina. Np. w pBR322 miejsce PstI zlokalizowane jest w genie β -laktamazy, między trypletami nukleotydowymi kodującymi aminokwasy 181 i 182 tegoż białka. To miejsce początkowo było używane przez S. Nagata i wsp., supra, w jego syntezie polipeptydów wykazujących immunologiczną i biologiczną aktywność IFN- α . Jedno z dwóch miejsc rozpoznawania endonukleazy HindII znajduje się między trypletami kodującymi aminokwasy 101 i 102. Jedno z kilku miejsc Taq w pBR322 znajduje się przy tryplecie kodującym aminokwas 45 w β -laktamazie. Podobnie, miejsca EcoRI i PvuII w tym plazmidzie leżą na zewnątrz jakiegokolwiek kodującego regionu, miejsca EcoRI zlokalizowane jest między genami kodującymi, odpowiednio, oporność na tetracyklinę i ampicylinę. Miejsca tego użyli T. Taniguchi i wsp., supra, w ich schemacie syntezy rekombinantowej. Miejsca te są dobrze znane znawcom. Należy oczywiście rozumieć, że nośnik klonujący użyteczny w sposobie według wynalazku nie musi zawierać miejsca rozpoznawania endonukleazy restrykcyjnej do włączenia wybranego fragmentu DNA. Zamiast tego nośnik można połączyć z fragmentem środkami alternatywnymi.

Wektor, czyli nośnik klonujący, a w szczególności miejsce wybrane do przyłączenia wyselekcjonowanego fragmentu DNA w rekombinantowej cząsteczce DNA jest zdeterminowane różnymi czynnikami, takimi jak ilość miejsc wrażliwych na enzymy restrykcyjne, wielkość cząsteczki białka powstającego w wyniku ekspresji, podatność pożądanego białka na degradację proteolityczną przez enzymy komórki gospodarza, zanieczyszczenie lub wiązanie białka powstającego w wyniku ekspresji przez białka komórki gospodarza trudne do oddzielenia podczas oczyszczania, charakterystyka ekspresji, w tym zlokalizowanie względem innych sekwencji wektora kodonów start i stop i innymi czynnikami oczywistymi dla znawców. Wybór wektora i miejsca insercji dla określonego genu jest określony przez wyważenie wypadkowej tych czynników, ponieważ nie każdy wybór jest równie efektywny w określonym przypadku.

Aczkolwiek znany jest szereg metod insercji obcego DNA do nośnika klonującego lub wektora w celu utworzenia rekombinantowej cząsteczki DNA, metodą korzystną w początkowym klonowaniu zgodnie ze sposobem według wynalazku jest działanie na plazmid (w szczególności pBR322) enzymem restrykcyjnym specyficznym dla miejsca wybranego do insercji (w szczególności PstI) i dodanie zakończeń dA do końców 3' za pomocą transferazji terminalnej. W podobny sposób wydłuża się dwuniciowy cDNA przez dodanie zakończeń dT do zakończeń 3' w celu umożliwienia połączenia przeciętego plazmidu. Następnie łączy się przecięty plazmid i cDNA w celu insercji cDNA do określonego miejsca plazmidu i do nadania hybrydowemu DNA postaci kolistej, przy czym komplementarny charakter przecięć umożliwia ich przyleganie (figura 1). Powstała w wyniku tego cząsteczka rekombinantowego DNA zawiera włączony gen w wybranym miejscu rozpoznawania PstI (figura 1). Ta metoda dodawania zakończeń dA-dT w celu insercji jest opisana przez D.A. Jacksona i wsp. w „Biochemical Methods For Inserting New Genetic Information Into DNA Of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes And The Galactose Operon Of Escherichia coli”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2904—2909 (1972) i przez R. Devosa i wsp., supra. W re-

zultacie daje ona 3-krotnie więcej plazmidu z rekombinantowym DNA niż dodawanie zakończeń dG-dG.

Oczywiście, również inne znane metody włączania sekwencji DNA do nośników klonujących są użyteczne w sposobie według wynalazku. Należą do nich takie sposoby jak dodawanie zakończeń dG-dC, bezpośrednie łączenie, syntetyczne łączniki, reakcje reperacji łączące się z egz nukleazami i polimerazami z następującym po tym łączeniem lub wydłużeniem nici DNA za pomocą polimerazy DNA i odpowiedniej jednoniciowej matrycy z następującym potem łączeniem.

Należy, oczywiście, rozumieć, że sekwencje nukleotydów, lub fragmenty DNA włączone do wybranych miejsc nośnika klonującego mogą zawierać nukleotydy, które nie stanowią części naturalnego genu strukturalnego żadanego polipeptydu, lub mogą zawierać tylko fragment całego genu strukturalnego żadanego białka. Jedynym wymaganiem jest to, aby, niezależnie od tego, jaką sekwencję DNA wprowadza się, transformowany gospodarz wytwarzał polipeptyd o biologicznej lub immunologicznej aktywności HuIFN- β , albo, aby sama sekwencja DNA była próbką do hybrydyzacji w celu selekcjonowania klonów zawierających sekwencje DNA użyteczne w wytwarzaniu polipeptydów wykazujących immunologiczną lub biologiczną aktywność HuIFN- β .

Nośnik klonujący czyli wektor zawierający obcy gen stosuje się do transformowania gospodarza w taki sposób, aby pozwolić na ekspresję polipeptydów wykazujących immunologiczną lub biologiczną aktywność HuIFN- β , który to interferon jest kodowany przez hybrydowy gen. Selekcja odpowiedniego genu gospodarza również jest kontrolowana przez pewną ilość czynników znanych. Należy do nich np. zgodność z wybranym nośnikiem, toksyczność białek kodowanych przez hybrydowy plazmid, łatwość odzyskiwania żadanego białka, charakterystyka ekspresji, bezpieczeństwo biologiczne oraz koszt. Wyważenie tych czynników należy zgrać biorąc pod uwagę, że nie wszystkie rodzaje gospodarzy są równie efektywne pod względem ekspresji określonej rekombinantowej cząsteczki DNA.

W syntezie prowadzonej sposobem według wynalazku korzystnym początkowym nośnikiem klonującym jest plazmid bakteryjny pBR322, a korzystnym początkowym miejscem rozpoznawania endonukleazy restrykcyjnej jest miejsce PstI (figura 1). Plazmid jest mały, o masie cząsteczkowej wynoszącej około 2,6 megadaltona. Zawiera on geny oporności na antybiotyki: ampicylinę (Amp) i tetracyklinę (Tet). Plazmid został całkowicie scharakteryzowany (F. Bolivar i wsp., „Construction And Characterization Of New Cloning Vehicles II. A Multi — Purpose Cloning System”, Gene, str. 95—113 (1977), J.G. Sutcliffe, „pBR322 Restriction Map Derived From The DNA Sequence: Accurate DNA Size Markers Up To 4361 Nucleotide Pairs Long”, Nucleic Acids Research, 5, 2721—2728 (1978), J.G. Sutcliffe, „Complete Nucleotide Sequence Of The Escherichia coli Plasmid pBR322”, Cold Spring Harbor Symposium, 43, I, 77—90 (1978/). Insercja DNA produktu do tego miejsca zapewnia dużą ilość klonów bakteryjnych, z których każdy zawiera DNA jednego genu lub jego fragmentu jako cDNA produktu uprzednio przygotowanego. Poza tym, tylko bardzo nieliczne z tych klonów zawierać będą gen IFN- β lub jego fragmenty (figura 1) i żaden z nich nie może wykazywać ekspresji polipeptydów wykazujących immunologiczną lub biologiczną aktywność IFN- β . Korzystnym początkowym gospodarzem, zgodnie ze sposobem według wynalazku, jest E. coli Hb 101.

1. Otrzymywanie pBR322 rozszczepionego PstI, wydłużonego dA. Plazmid pBR322 trawi się całkowicie endonukleazą PstI (New England Biolabs) w 10 mM Tris — HCL (pH 7,6), 7 mM MgCl₂, 7 mM 2-merkaptotetanolu, w temperaturze 37°C. Otrzymaną mieszaninę ekstrahuje się 1 objętością fenolu i 10 objętościami eteru i wytrąca 2,5 objętościami etanol: 0,2 M roztwór octanu sodowego.

Dodania homopolimerycznych zakończeń dA (fig 1) za pomocą terminalnej dezoksynukleotydylowej transferazy (TdT) oczyszczonej według metody L.Changa i F.J. Bolluma („Deoxynucleotide-Polymerizing Enzymes Of Calf Thymus Gland”, J. Biol. Chem., 246, 909, 916 (1971/)) dokonuje się w objętości mieszaniny reakcyjnej wynoszącej 50 μ l, w obecności 0,14 M kakodylanu potasowego, 30 mM Tris — HCl o pH 6,8, 1 mM CoSO₄, 0,2 μ g/ml zinaktywowanej ciepłem bydlęcej albuminy surowiczej, 0,8 mM DTT, 0,2 mM dATP i pewnej ilości α -³²P-dATP.

Inkubację prowadzi się w temperaturze 37°C w ciągu 5 minut, po czym dodaje się EDTA do stężenia 10 mM i SDS do 0,1%. Otrzymaną mieszaninę ekstrahuje się fenolem i poddaje chromatografii na Sephadex G 50 w buforze TE. Frakcję zerową zawierającą liniowy wydłużony pBR322 oczyszcza się dalej przez adsorpcję na oligo(dT) — celulozie w 10 mM Tris — HCl o pH 7,8, 1 mM EDTA i 0,4 M NaCl. Po ekstensywnym przemyciu, żądane frakcje eluuje się 10 mM Tris — HCl o pH 7,8 i 1 mM EDTA.

2. Przygotowanie DNA wydłużonego dT. Dwuniciowy DNA wydłuża się resztami dTMP w podobny sposób jak wyżej opisano w przypadku pBR322 wydłużonego dA, z tym wyjątkiem, że zamiast dATP i α -³²P-ATP używa się pewnej ilości ³H-dTTP. Oczywiście, pomija się oczyszczanie na oligo(dT)-celulozie. Tak jak poprzednio, DNA wydłużony dT jest mieszaniną różnych rodzajów DNA, z których nieliczne tylko odpowiadają HuIFN- β (figura 1).

3. Otrzymywanie E. coli HB101 potraktowanej Ca⁺⁺. E. coli HB 101 potraktowaną Ca⁺⁺ przygotowuje się metodą E.M. Lederbergera i S.N. Cohena („Transformation Of Salmonella Typhimurium By Plasmid Deoxyribonucleic Acid”, J. Bacteriol., 119, 1072—1074 /1974/) przez wprowadzenie E. coli HB101, otrzymanej od H. Boyera, do 5 ml podłoża LB (10 części preparatu bactotryptone, 5 części ekstraktu dożdżowego i 5 części NaCl na litr), po czym hodowle rosną przez noc w temperaturze 37°C. Świeże hodowle rozcieńcza się 1/100 w 20 ml podłoża LB i prowadzi hodowlę do gęstości komórek około 2×10^8 bakterii/ml, po czym szybko oziębia na lodzie i osadza przez odwirowanie w ciągu 5 minut przy 6000 obr/min w temperaturze 4°C, z użyciem wirnika Sorvall SS34. Komórki przetrzymane w temperaturze 0—4°C przemywa się 20 ml 100 mM CaCl₂. Po upływie 20 minut przetrzymywania w lodzie komórki ponownie osadza się i zawiesza w 2 ml 100 mM CaCl₂, a następnie przetrzymuje w temperaturze 0°C w ciągu 15 minut. 200 μ l próbki uzupełnione gliceryną do stężenia 11% można przechowywać przez szereg miesięcy w temperaturze -80°C bez utraty aktywności (D.A. Morrison, „Transformation In Escherichia coli: Cryogenic Preservation Of Competent Cells”, J. Bacteriol., 132, 349—351 /1977/).

4. Połączenie pBR322 wydłużonego dA i DNA wydłużonego dT. Komplementarne zakończenia wektora i DNA, który ma być wprowadzony, pozwalają na połączenie z utworzeniem uprzednio żadanego hybrydowego plazmidu czyli rekombinantowej cząsteczki DNA. W tym celu wektor pBR322 przecięty PsTI wydłużony dA i mieszaninę DNA wydłużonych dT o dobranej wielkości rozpuszcza się w buforze TSE (10 mM Tris — HCl o pH 7,6, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl) do stężenia plazmidu 1,5 μ g/ml i stosunku molowego DNA (który ma zostać wprowadzony) do plazmidu wynoszącym 1,5 do 2,0. Po ogrzewaniu w temperaturze 65°C w ciągu 10 minut, mieszaninę oziębia się powoli, w ciągu 4 godzin, do temperatury pokojowej.

Produkt, oczywiście, stanowi mieszaninę różnych rekombinantowych cząsteczek DNA i pewnej ilości nośnika klonującego bez włączonych sekwencji DNA. Tym niemniej jednak, każda rekombinantowa cząsteczka DNA zawiera cDNA jako fragment włączony do miejsca PstI. Każdy taki fragment cDNA może zawierać gen lub jego fragment. Tylko bardzo nieliczne fragmenty cDNA kodują HuIFN- β lub jego część (figura 1). Znaczna większość koduje jedno z innych białek lub ich części, którym to białkom odpowiadające mRNA są częścią poli(A) RNA używanych w sposobie według wynalazku (figura 1). Należy również rozumieć, że żaden z tych klonów, otrzymanych w sposób wyżej opisany, nie może ulegać ekspresji z utworzeniem polipeptydów wykazujących immunologiczną lub biologiczną aktywność IFN- β .

5. Transfekcja E. coli HB101 połączonymi hybrydowymi plazmidami. W trakcie procesu transfekcji i wszystkich następnych stadiów, w których manipuluje się transformowanymi bakteriami, niezbędny jest poziom zabezpieczenia biologicznego P3. Próbkę (90 μ l lub mniejsze) powyższej mieszaniny oziębia się do temperatury 0°C i dodaje 1 M CaCl₂ do stężenia 0,1 M. Próbkę (100 μ l lub mniejsze) tego roztworu dodaje się do komórek E. coli HB101 potraktowanych Ca⁺⁺ w objętości 200 μ l, na lodzie i po przetrzymaniu w temperaturze 0°C w ciągu 30 minut komórki poddaje się wstrząsowi cieplnemu w ciągu 5 minut w temperaturze 37°C, po czym ponownie oziębia do temperatury 0°C na 15 minut. Po dodaniu 2 ml podłoża LB komórki inkubuje się w temperaturze 37°C we wstrząsanej łaźni wodnej w ciągu 30—45 minut, a następnie

zawieszoną bakteryjną wysiewa się na płytki z 1,2% agarom zawierającym podłoże LB uzupełnione tetracykliną w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$.

Ponieważ plazmid pBR322 zawiera gen oporności na tetracyklinę, *E. coli*, jako gospodarz, transformowana plazmidem zawierającym ten gen nie naruszony, będzie rosła w podłożach zawierających ten antybiotyk, z wykluczeniem tych bakterii, które nie zostały transformowane. Tak więc, wzrost w hodowli zawierającej tetracyklinę pozwala na selekcję gospodarzy transformowanych rekombinantową cząsteczką DNA, czyli wektorem, przywróconym do postaci kolistej.

Po 24-godzinnej inkubacji w temperaturze 37°C, wyizolowuje się poszczególne kolonie i zawieszają w 100 μl podłoża LB, uzupełnionego jak wyżej opisano, w dołkach płytek do mikromiatareczkowania (Dynatech). Po całkowitej inkubacji w temperaturze 37°C, do każdego dołka dodaje się przy mieszaniu 11 μl dwumetylosulfotlenku i zamyka płytki taśmą przylepną. Płytki przechowuje się w temperaturze -20°C i otrzymuje się zbiór 17 000 poszczególnych klonów transformowanej *E. coli* HB101. Zbiór ten uzyskuje się z 270 femtomoli (128 ng) cDNA wydłużonego dT jako fragmentów do włączenia, który z kolei otrzymuje się z 4,4 μg poli(A) RNA oczyszczonego w gradiencie. Około 98% tych klonów z tego zbioru jest wrażliwych na karbenicylinę (bardziej stabilną pochodną ampicyliny). A więc, około 98% zbioru zawiera plazmid z wprowadzonym DNA w miejscu PstI genu β -laktamazy pBR322, a tylko 2% zbioru zawiera plazmid przywrócony do postaci kolistej bez wprowadzonego DNA. Te 17 000 klonów zawiera różne rekombinantowe cząsteczki DNA reprezentujących całkowite lub częściowe kopie mieszaniny mRNA w preparacie poli(A) RNA z komórek tworzących HuIFN- β (figura 2). Większość zbioru zawiera tylko pojedynczą rekombinantową cząsteczkę DNA. Jedynie bardzo nieliczne z tych rekombinantowych cząsteczek DNA odpowiadają HuIFN- β . Z tego powodu trzeba poddać klony screeningowi w celu oddzielenia klonów odpowiadających HuIFN- β od innych.

Screening klonów zawierających cDNA HuIFN- β

Istnieje kilka podejść do zagadnienia screeningu klonów bakteryjnych zawierających cDNA HuIFN- β . Należy do nich np. selekcyjna hybrydyzacja RNA (Alwine i wsp., poniżej), hybrydyzacja różnicująca (T.P. St. John i R.W. Davis, „Isolation Of Galactose-Inducible DNA Sequences From *Saccharomyces Cerevisiae* By Differential Plaque Filter Hybridization”, *Cell*, **16**, 443—452 /1979/), hybrydyzacja z próbką syntetyczną (B. Noyes i wsp., „Detection And Partial Sequence Analysis Of Gastrin mRNA By Using An Oligodeoxynucleotide Probe”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1770—1774 /1979/), albo screening klonów tworzących żądane białko w oparciu o badania immunologiczne (L. Villa-Komaroff i wsp., „A Bacterial Clone Synthesizing Proinsulin”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3727—3731 /1978/) lub biologiczne (A.C.Y. Chang i wsp., „Phenotypic Expression In *E. coli* Of A DNA Sequence Coding For Mouse Dihydrofolate Reductase”. *Nature*, **275**, 617—624 /1978/). Wybrano selekcyjną hybrydyzację RNA jako najbardziej dogodną i obiecującą metodę pierwotnego screeningu.

A. Badania związane z selekcyjną hybrydyzacją RNA.

1. Ogólny przegląd badania wstępnego. Nawiązując do figury 2, izoluje się rekombinantowe cząsteczki DNA z poszczególnych hodowli około 46 klonów wrażliwych na karbenicylinę i opornych na tetracyklinę z powyższego zbioru klonów (2 mieszaniny 2 klonów uwidoczono na fig. 2) (Stadium A). Rekombinantowe cząsteczki DNA rozszczepia się i hybrydyzuje z całkowitym RNA zawierającym mRNA HuIFN- β otrzymanym w powyżej opisany sposób (Stadium B). Wszystkie hybrydy rekombinantowa cząsteczka DNA-całkowity RNA oddziela się od nie zhybrydyzowanego całkowitego RNA (Stadium C). Zhybrydyzowany całkowity RNA odzyskuje się z hybryd i oczyszcza (Stadium D). Odzyskany RNA bada się pod względem aktywności mRNA HuIFN- β w powyżej opisany sposób (Stadium E). Jeśli, i tylko jeśli, rekombinantowa cząsteczka DNA zawiera włączoną sekwencję nukleotydową zdolną do hybrydyzowania z mRNA HuIFN- β w całkowitym RNA, w surowo przestrzeganych warunkach hybrydyzacji, mRNA odzyskany z hybryd spowoduje tworzenie się HuIFN-B w oocytach, ponieważ mRNA odzyskany z hybrydy: jakkolwiek inna rekombinantowa cząsteczka DNA-całkowity RNA nie będzie odpowiadać IFN- β . Jeśli grupa 46 klonów daje pozytywną odpowiedź, klony przegrupowuje się w 6 podgrup (4

podgrupy po 8 i 2 podgrupy po 7) i każdą podgrupę bada się jak poprzednio. Proces ten kontynuuje się aż do otrzymania pojedynczego klonu odpowiadającego na to badanie.

Nie ma pewności, czy rekombinantowe cząsteczki DNA i hodowle bakteryjne nimi transformowane, które zostają zidentyfikowane, zawierają całkowitą sekwencję cDNA IFN- β , a nawet czy sekwencja DNA rzeczywiście koduje IFN- β lub pozwoli klonom na ekspresję polipeptydów wykazujących immunologiczną lub biologiczną aktywność IFN- β . Tym niemniej, rekombinantowe cząsteczki DNA będą z pewnością zawierać długą sekwencję nukleotydową komplementarną do sekwencji kodującej mRNA IFN- β . Tak więc, rekombinantowa cząsteczka DNA może być przynajmniej użyta jako źródło próbki do szybkiego screeningu innych rekombinantowych cząsteczek DNA i klonów transformowanych nimi, które mogą zawierać naturalną lub całkowitą sekwencję nukleotydową kodującą IFN- β . Klony te można następnie analizować pod względem możliwej ekspresji polipeptydów wykazujących biologiczną lub immunologiczną aktywność IFN- β . Można określić sekwencję nukleotydową fragmentu DNA włączonego do tych zhybrydizowanych plazmidów, jak i skład aminokwasowy produktu translacji i porównać, jeśli to możliwe, ze składem aminokwasowym i wyjściową sekwencją odnoszącą się do naturalnego IFN- β , o której już donoszono (supra).

2. Wykonanie badania wstępnego.

Stadium A. Otrzymywanie mieszaniny rekombinantowych cząsteczek DNA.

Wykonuje się repliki płytki do mikromiareczkowania zawierającej 96 klonów z powyższego zbioru klonów na płytkach zawierających agar z podłożem LB, przy czym jedna zawiera tetracyklinę w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$, a druga jest uzupełniona karbenicyliną w stężeniu 100 $\mu\text{g/ml}$. W ten sposób, dwa zestawy o około 45—46 klonach, opornych na tetracyklinę i wrażliwych na karbenicylinę, pobiera się oddzielnie i prowadzi ich całonocną hodowlę w temperaturze 37°C w 100 ml podłoża LB, zawierającego tetracyklinę w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$. Hodowle te łączy się, odwirowuje przy 8000 obr/min przez 10 minut, wykorzystując wirnik Sorvall GS-3, przemywa dwukrotnie buforem TES (50 mM Tris — HCl o pH 8, 5 mM EDTA, 5 mM NaCl) i zawiesza ponownie w 40 ml TES/litr objętości pierwotnej hodowli. Przeprowadza się lizę komórek lizozymem-Tritonem X-100 (M. Kahn i wsp., „Plasmid Cloning Vehicles Derived From Plasmids Col E1, F, R6K And RK2” w „Methods in Enzymology, 68: Recombinant DNA (R. Wu, wyd.) (1980)(w druku)). 40 ml zawiesiny komórek w TES łączy się z 20 ml 10% sacharozy w 50 mM Tris — HCl o pH 8,0 i lizozymem do stężenia 1,3 mg/ml i odstawia na 30 minut w temperaturze pokojowej. Do tej zawiesiny dodaje się 1 ml 0,5 mM EDTA-NaOH (pH 8), 8 ml 0,2% Triton X-100, 25 mM EDTA, 50 mM Tris — HCl o pH 8,0 i doprowadza lizę do końca w ciągu 30 minut w temperaturze pokojowej. Usuwa się komórkowy debris i większość chromosomalnego DNA przez osadzenie za pomocą odwirowania w 24 000 obr/min przez 45 minut wykorzystując wirnik Beckman SW27. Supernatant oziębia się na lodzie, łączy z 1/3 objętości 40% glikolu polietylenowego 6000-2 M NaCl i odstawia na noc w temperaturze 0°C. Otrzymany osad zbiera się odwirowując przy 5000 obr/min w temperaturze 4°C z wykorzystaniem wirnika Sorvall HB4, a następnie rozpuszcza w buforze TES. Roztwór, z 0,2 objętości 10 mg/ml bromku ethidium (Serva) i CsCl do 1 g/ml wiruje się przy 40 000 obr/min przez co najmniej 48 godzin z wykorzystaniem wirnika Beckmann R60 Ti, przy czym jedna próbówka poliallomerowa zazwyczaj wystarcza na lizat z 1 — 2 litrów objętości pierwotnej hodowli.

W próbówce można uwidocznnić dwa pasma DNA za pomocą oświetlenia UV. Pasma o większej gęstości odpowiada DNA plazmidu w postaci I, a drugie pasmo odpowiada postaci II i III plazmidowych DNA oraz pewnej ilości chromosomalnego DNA. Zbiera się z próbówki pasmo pierwsze, usuwa bromek ethidium za pomocą 6-krotnej ekstrakcji alkoholem izoamylowym i fazę wodną rozcieńcza się 3 objętościami wody uzupełnionej octanem sodowym do stężenia 0,2 M (pH 5,1) przed wytrąceniem DNA 2,5 objętości etanolu. DNA rozpuszcza się ponownie, ekstrahuje fenolem i ponownie wytrąca się etanolem. Jakość DNA śledzi się za pomocą elektroforezy w 1% żelu agarozowym w 40 mM Tris — kwas octowy o pH 7,8, 20 mM octanie sodowym, 2 mM EDTA, a następnie stosuje się bromek etidium. Jeśli DNA jest zanieczyszczony zbyt wielką ilością RNA, oczyszcza się go dalej przez wirowanie w obojętnym gradiencie sacha-

rozy: 300 μg DNA w 10 mM Tris — HCl o pH 7,6 i 1 mM EDTA nanosi się na 36-mililitrowy 5—20% gradient sacharozy w 10 mM Tris — HCl o pH 7,6, 1 mM EDTA, 1 M NaCl, wiruje się w próbówce poliallomerowej przy 24 000 obr/min w ciągu 16 godzin w temperaturze 18°C, wykorzystując wirnik Beckmann SW 27, łączy się frakcje zawierające DNA (OD_{260}) i wytrąca za pomocą octanu sodowego i etanolu.

Stadium B. Hybrydyzacja DNA z całkowitym RNA.

Okolo 150 μg DNA tak otrzymanego, łączy się z pewną ilością jednorodnie znakowanego ^{36}P DNA stanowiącego marker i 2 μg DNA pSTNV-1 (plazmid rekombinantowy zawierający cDNA w postaci pełnej wielkości kopii RNA ułomnego wirusa martwicy tytoniu (STNV) (J. Van Emmelo i wsp., „Construction And Characterization Of A Plazmid Containing A Nearly Full — Size DNA Copy Of Satellite Tobacco Necrosis Virus RNA”, J. Mol. Biol. (w druku), stanowiącego kontrolę wewnętrzną, dezintegruje za pomocą nadźwiękowania w dezintegratorze ultradźwiękowym MSE i wytrąca za pomocą octanu sodowego i etanolu.

Stałą matrycę stanowiącą dwuazobenzylksymetylo (DBM)-celulozę (J.C. Alwine i wsp., „Method For Detection Of Specific RNAs In Agarose Gels By Transfer To Diazobenzyl Oxymethyl Paper And Hybrydyzing With DNA Probes”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5350—5354 /1977/) przygotowuje się zgodnie z metodą J.C. Alwine i wsp.: „Detection Of Specific RNAs Or Specific Fragments Of DNA Fractionation In Gels And Transfer To Diazobenzylksymethyl Paper”, Methods — Enzymology, 68: Recombinant DNA (R. Wu, wyd.) (1980). W celu przygotowania matrycy bibułowej, arkusz bibuły Whatman 540 równomiernie nasycy się roztworem zawierającym 2—3 mg chlorku 1-(m-nitrobenzylksy)metylopirydyniowego (NBPC/BDH) i 0,7 ml trójwodzianu octanu sodowego w 28,5 μl wody/ cm^2 , przetrzymuje w temperaturze 60°C aż do wyschnięcia i jeszcze przez 10 minut, po czym wygrzewa w temperaturze 130—135°C w ciągu 30—40 minut. Po kilkukrotnym przemyciu wodą w ciągu około 20 minut i trzykrotnym przemyciu acetonem w ciągu około 20 minut, suszy się i przechowuje. Bibułę inkubuje się w temperaturze 60°C w ciągu 30 minut w 0,4 ml 20% roztworu podsiarczynu sodowego w wodzie/ cm^2 ze sporadycznym wstrząsaniem. Bibułę ponownie przemycywa się czterokrotnie wodą, 1 raz 30% kwasem octowym w ciągu 5 minut oraz czterokrotnie wodą, przenosi do 0,3 ml 1,2 M HCl o temperaturze lodu/ cm^2 , przy czym do kwasu solnego dodaje się bezpośrednio przed użyciem 10 mg/ml świeżego NaNO_2 i inkubuje w ciągu 30 minut w temperaturze 0°C.

Następnie szybko przemycywa się dwukrotnie wodą o temperaturze lodu i 1 raz mieszaniną zawierającą 80% dwumetylosulfotlenku (czystości spektralnej, Merck) i 20% 25 mM fosforanu sodowego o pH 6,0. W celu przygotowania matrycy sproszkowanej powtarza się tę samą procedurę z użyciem mikrogranulowanej celulozy w proszku (Whatman CC31). Użyte ilości wyraża się w odniesieniu do odpowiadającej wagi matrycy celulozowej.

Z początku używano sproszkowanej matrycy, ponieważ jej zdolność wiązania jest wyższa, tak więc można użyć względnie mniejszych objętości do hybrydyzacji, przemycia i elucji. Następnie do screeningu pojedynczych klonów używano matrycy bibułowej. Użycie bibuły pozwala na skuteczną elucję wodą, co zapewnia wyższość w dalszych badaniach mRNA IFN- β .

Rozpuszcza się DNA, otrzymany jak wyżej opisano, w 25 mM fosforanie sodowym o pH 6,0, ogrzewa w ciągu 1 minuty, po czym oziębia i dodaje 4 objętości DMSO. Wiązanie z matrycą (50 mg proszku lub krążek bibuły o średnicy 10 mm) zazwyczaj prowadzi się przez weekend w temperaturze 4°C ze stałym mieszanym. Roztwór DNA urzymuje się raczej w niewielkiej objętości, żeby umożliwić ścisły kontakt z matrycą i zwiększyć skuteczność wiązania DNA z matrycą. Po związaniu, matrycę przemycywa się 4-krotnie wodą i 4-krotnie 0,4 NaOH w temperaturze 37°C prowadząc każde przemycie przez 10 minut, następnie przemycywa się 4-krotnie wodą w temperaturze pokojowej i na koniec 2-krotnie buforem do hybrydyzacji (50% formamid, dejonizowany, Baker), 40 mM kwas piperazyno-N,N'-bis(2-etanosulfonowy) (pH 6,4) (PIPES, Sigma), 1 mM EDTA, 0,6 M NaCl i 0,1% SDS w temperaturze 4°C. Skuteczność wiązania mierzy się na podstawie promieniotwórczości ^{32}P .

Rozpuszcza się 20 μg całkowitego RNA, otrzymanego jak wyżej opisano i 50 ng STNV-RNA w 250 μl (50 μl w przypadku matrycy bibułowej) buforu do hybrydyzacji i dodaje się do DNA

związanego z matrycą. Matrycę ogrzewa się w temperaturze 70°C w ciągu 2 minut i przetrzymuje w temperaturze 37°C przez noc z łagodnym mieszaniem.

Stadium C. Oddzielenie zhybrydyzowanego całkowitego RNA-DNA od nie zhybrydyzowanego całkowitego RNA.

Po odwirowaniu sproszkowanej matrycy nie zhybrydyzowane RNA usuwa się i matrycę przemywa 7 razy ogółem 2 ml 50% formamidu, 10 mM PIPES o pH 6,4, 1 mM EDTA, 0,3 M NaCl i 0,1% SDS, przy czym niższe stężenie soli przy tym przemywaniu destabilizuje niespecyficzne wiązanie RNA-DNA. Każde przemycie kończy się wirowaniem i ponownym zawieszeniem matrycy w buforze. Do dalszych badań łączy się pierwsze przemycie z nie zhybrydyzowanym RNA (frakcja 1), przemycie 2—4 (frakcja 2) i przemycie 5—7 (frakcja 3). Przy hybrydyzacji z matrycą bibułową stosuje się podobną procedurę z wyjątkiem ograniczenia całkowitej objętości do 1 ml.

Stadium D. Oczyszczanie zhybrydyzowanego całkowitego RNA. Eluuje się zhybrydyzowany całkowity RNA-DNA ze sproszkowanej matrycy dokonując 3 elucji, z użyciem łącznie 900 μ l 99% formamidu, 0,2% SDS, w temperaturze 70°C, w ciągu 2 minut, po czym eluat oziębia się na lodzie. Całkowity proces hybrydyzacji i elucji formamidem prowadzi się zasadniczo w sposób opisany przez A.G. Smitha (informacja ustna). Zhybrydyzowany całkowity RNA-DNA eluuje się z matrycy bibułowej za pomocą przemycia 1 raz 100 μ l wody o temperaturze lodu, a następnie 2 razy eluując wodą w ogólnej ilości 300 μ l, w temperaturze 80°C, w ciągu 2 minut. Do dalszych badań łączy się eluaty i 100 μ l przemyciek (frakcja 4).

Do połowy każdej z 4 frakcji dodaje się 0,1 μ g tRNA lub rybosomalnego RFN (rRNA) z wątroby cielęcej (frakcje 1A, 2A, 3A i 4A), a do drugiej połowy dodaje się 8 μ g eukariotycznego poli(A) RNA lub rRNA (frakcje 1B, 2B, 3B, 4B). Frakcje oczyszcza się przez wytrącenie dodatkiem 0,5 M NaCl i 2,5 objętości etanolu w celu usunięcia śladów formamidu i innych zanieczyszczeń.

Stadium E. Określenie aktywności mRNA IFN- β .

Prowadzi się translację frakcji 1A, 2A, 3A i 4A w 25 μ l lizatu króliczych retikulocytów potraktowanych nukleazą (wytworzonego zgodnie z metodą R.B. Pelhama i R.J. Jacksona („An Efficient mRNA — Dependent Translation System For Reticulocyte Lysates, Eur. J. Biochem., 7, 247—256 /1976/) według metody B. LeBleu i wsp. (Translation Of Mouse Interferon mRNA In *Xenopus* Laevis Oocytes And in Rabbit Reticulocyte Lysates”, Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, 665—673 /1978/, z tą różnicą, że dodaje się 250 mM spermidyny-HCl i 1 mM fruktozo-1,6-dwufosforanu w obecności ³⁵S-metioniny (0,5 mCi/ml, Amersham). Po inkubacji łączy się 25 μ l lizatu retikulocytów, otrzymanego w sposób jak wyżej opisano, z 1 μ l 10% dezoksycholan — 10% Triton X100 i 2 μ l immunosurowicy — PBS (1:9), po czym całość ogrzewa się w temperaturze 37°C w ciągu 1 godziny. Dodaje się 20 μ l Cowan I *Staphylococcus aureus* (świeżo przemyty, S.W. Kessler i wsp., „Rapid Isolation Of Antigens From Cells With A Staphylococcal Protein A-Antibody Adsorbent: Parameters Of The Interaction Of Antibody — Antigen Complexes With Protein A”, J. Immunology, 115, 1617—1624/1975/) w 10% 100 mM NaCl, 10 mM Tris — HCl o pH 7,4, 1 mM EDTA, 0,05% NP 40 i otrzymaną mieszaninę utrzymuje się w temperaturze 20°C w ciągu 30 minut, a następnie wiruje w wirówce Eppendorf 5412 w ciągu 2 minut. Osadzoną substancję przemywa się i odwirowuje 2 razy z PBS, w końcu osad rozpuszcza się w próbce buforu i poddaje elektroforezie w 13% żelu poliakryloamidowym, jak to opisali U.K. Laemmli i wsp. (Cleavage Of Struktural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T 4”, Nature, 227, 680—685 /1970/), a następnie wykonuje się autoradioautografię. Porównanie produktów translacji STNV-RNA we frakcjach 1A i 4A jest wskazówką skuteczności hybrydyzacji i degradacji RNA w tym procesie.

Frakcje 1B, 2B, 3B i 4B rozpuszcza się w 2 μ l wody i bada na oocytach pod względem zawartości mRNA IFN- β w sposób jak opisano w powyższej części opisu.

3. Dalsze badania — hybrydyzacja na arkuszach nitrocelulozy.

Niektóre z poniższych badań poszczególnych klonów wykonuje się na arkuszach nitrocelulozy (M. Cochet i wsp., „Cloning Of An Almost Full-Lenght Chicken Conalbumin Double-

-Stranded cDNA", Nucleic Acids Research, 6, 2435—2452 /1979/). DNA rozpuszcza się w 2 M NaCl i 0,2 M NaOH, po czym ogrzewa w temperaturze 100°C w ciągu 1 minuty, a następnie oziębia i nakrapla na wolne od detergentów saszki miliporowe (wielkość porów 0,45 μ m, średnica 7 mm). Saszki wygrzewa się w temperaturze 80°C w ciągu 2 godzin, przemywa 0,3 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,1% SDS, 10 mM Tris — HCl o pH 7,5 i suszy w temperaturze pokojowej. RNA hybrydyzuje się w temperaturze 47°C, w ciągu 3 godzin, w 30% formamidzie, 0,5 M NaCl, 0,4% SDS, 2 mM EDTA, 50 mM PIPES (o pH 7,5). Hybrydyzację kończy się przez rozcieńczenie 10 objętościami 0,1 M NaCl i saszki przemywa kilka razy 15 ml 0,3 M NaCl, 0,1% SDS, 2 mM EDTA, 10 mM Tris — HCl o pH 7,5 przez wstrząsanie w temperaturze 45°C i kilka razy tym samym roztworem bez SDS w temperaturze 4°C. Elucję zhybrydyzowanego RNA-DNA przeprowadza się w 30 μ l 5 mM KCL w temperaturze 100°C ciągu 1 minuty.

4. Wyniki badań nad selekcyjną hybrydyzacją RNA.

Poddaje się screeningowi 16 grup o około 46 klonach (grupy A — P). W 6 z tych grup frakcja 1B wykazuje aktywność tylko mRNA IFN- β , a w 8 z tych grup nie wykrywa się mRNA IFN- β i w 2 grupach (grupy C i O) mRNA IFN- β obserwuje się we frakcji 4B. Badania grup C i O rejestruje się w następujący sposób: logarytm jednostek IFN- β (kalibruje się w odniesieniu do wzorca porównawczego 69/19) wykrytych przy badaniu frakcji 1B, nie zhybrydyzowanej, i przy badaniu frakcji 4B, zhybrydyzowanej. Granica wykrywalności wynosi 0,1.

Grupa	Frakcja 1B	Frakcja 4B
C	1,0	0
	0,5	0,5
	0	0,2
0	0	0
	0,2	0,5

Grupę 0 dzieli się wtórnie na 6 podgrup (podgrupy 0₁—0₆, 4 po 8 klonów i 2 po 7 klonów), hybrydyzuje i bada jak wyżej opisano z tym wyjątkiem, że używa się 400 ml hodowli na 1 klon. Podgrupy dają następujące wyniki, przedstawione w ten sam sposób, jak wyżej. Hybrydyzację prowadzi się na DMB — celulozie w postaci proszku, jeżeli tego nie wskazano inaczej.

Podgrupa	Frakcja 1B	Frakcja 4B
0 ₁	0	1,2
	0	1,5
	0	0,5
	0	0,5
	0,2	0,5
	0	1,2*
0 ₂	0,7	0
0 ₃	0,7	0
	0,5	0
0 ₄	0	0
0 ₅	0,5	0
0 ₆	0	0

* Metoda z użyciem DBM-celulozy w postaci bibuły

Podgrupę 0₁ dzieli się wtórnie na pojedyncze klony (oznaczone jako klony 0_{1/1}—0_{1/8}), hybrydyzuje i bada jak wyżej opisano, z tą różnicą, że używa się 700 ml hodowli/klon. Hybrydyzację prowadzi się w dalszym ciągu na DBM-celulozie w postaci proszku, jeśli tego nie wskazano inaczej.

Klon	Frakcja 1B	Frakcja 4B
0 _{1/1}	0,2	0
	0,7	0
	0,7	0*
	1,0	0**
0 _{1/2}	1,2	0
	0,2	0*
	0,7	0**
0 _{1/3}	1,2	0
	1,0	0,2*
	1,2	1,0 (7)*
	1,2	0**
0 _{1/4}	1,2	0
	1,2	0
	1,0	0*
	1,2	0**
0 _{1/5}	0,7	0
	0,7	≤0,2*
	1,0	0
0 _{1/6}	0,7	0
	1,0	≤0,2*
	0,5	0**
0 _{1/7}	0,5	0
	1,2	0*
	<0,2	0,5**
-0 _{1/8}	1	1,7*
	<0,2	1,2*
	0	0,7**
	0	1,0**

* Metoda z użyciem DBM-celulozy w postaci bibuły

** Arkusze nitrocelulozy

Tak więc, klon 0_{1/8} zawiera rekombinantową cząsteczkę DNA zdolną do hybrydyzowania z mRNA IFN- β z całkowitego RNA zawierającego mRNA IFN- β .

Niespecyficzne wiązanie RNA-DNA jest w wysokim stopniu nieprawdopodobne, gdyż porównanie frakcji 1A i 4A nie ujawnia zasadniczo niespecyficznego wiązania STNV/DNA w tych samych eksperymentach. Np. rejestruje się to przy translacji w lizacie króliczych retikulocytów w obecności ³⁵S-metioniny, a następnie elektroforezy w żelu, jak opisano w powyższej części opisu. Klon 0_{1/8} oznacza się E. coli HB101 (G-pBR322(Pst)/HFIF1 („G-HB101-pHFIF1”), jego rekombinantową cząsteczkę DNA G-pBR322(Pst)HFIF1 („pHFIF1”), a jego hybrydowy wprowadzony fragment „fragment pHFIF1”. Nomenklatura ta wskazuje że klon i rekombinantowa cząsteczka DNP pochodzi z Gent („G”) i zawiera plazmid pBR322 zawierający cDNA Hu IFN- β („HFIF”) w miejscu PstI, przy czym określona cząsteczka zajmuje pozycję pierwszą („1”).

Identyfikacja klonów zawierających rekombinantowe cząsteczki DNA krzyżowo hybrydujące z pHFIF1.

pHFIF1, izolowanego sposobem jak opisano w powyższej części opisu, używa się do sreeningu zbioru klonów bakteryjnych, otrzymanych uprzednio, pod tym względem, czy zawierają rekombinantowe cząsteczki DNA zawierające pokrewny, hybrydowy, wprowadzony fragment DNA, przez hybrydyzację w kolonii (M. Grunstein i D.S. Hogness, „A Method For The Isolation Of Cloned DNA's That Contain A Specific Gene”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961—3965 (1975)). Metoda ta pozwala na szybką identyfikację pokrewnych klonów przez hybrydyzację promieniotwórczej próbki otrzymanej z pHFIF1 z DNA lizatów kolonii bakteryjnych unieruchomionych na sączkach nitrocelulozowych.

Wykonuje się replikę zbioru klonów, przechowywanych w płytkach do mikromiareczkowania jak wyżej opisano, na podobnej wielkości arkuszach nitrocelulozowych (średnica porów 0,45 μ m, Schleicher and Schuel lub Millipore), które uprzednio wygotowano w celu usunięcia detergentu i umieszcza arkusze na płytkach z agarem LB zawierającym tetracyklinę (10 μ g/ml). Kolonie bakteryjne hoduje się przez noc w temperaturze 37°C. Liza i unieruchomienie bakterii na arkuszach nitrocelulozy odbywa się za pomocą kolejnych przemywań 0,5 N NaOH (2 razy po 7

minut), 1 M Tris — HCl o pH 7,5 (7 minut), 0,5 M Tris — HCl o pH 7,5 i 1,5 M NaCl (7 minut), 2 razy SSC (0,15 M NaCl, 0,015 M cytrynian sodowy o pH 7,2 (7 minut). Po przepuszczeniu etanolu przez arkusze i wysuszeniu na powietrzu, wygrzewa się w temperaturze 80°C w ciągu 2 godzin pod zmniejszonym ciśnieniem i przechowuje w temperaturze pokojowej.

Fragment restrykcyjny Hinf I, specyficzny w stosunku do fragmentu pHFIF1 (poniżej) służy jako próbka do hybrydyzacji w kolonii opisanej w poniższej części opisu. Fragment ten (około 170 bp) oczyszcza się za pomocą elektroforezy produktu trawienia Hinf pHFIF1 w 6% żelu poliakrylamidowym. Po zabarwieniu pasm DNA bromkiem etydium, specyficzny fragment eluuje się, poddaje ponownej elektroforezie i znakuje ^{32}P przez „nick translation” (P.W.J. Rigby i wsp., „Labeling Deoxyribonucleic Acid To High Specific Activity In Vitro By Nick Translation With DNA Polymerase I”, J. Biol. Mol., 113, 237—251 (1977)) za pomocą inkubowania w 50 litrach mM Tris — HCl o pH 7,4, 10 mM MgCl_2 , 20 mM β -merkaptetanolu, zawierających po 2,5 μl 400 μM każdego z dCTP, dTTP, dGTP, 100 pikomoli α -ATP (Amersham, 2000 Ci/milimol) i 2,5 jednostki polimerazy DNA I (Boehringer) w temperaturze 14°C w ciągu 45 minut. Trójfosforany dezoksynukleotydów, które nie przereagowały, usuwa się za pomocą sączenia żelowego przy użyciu Sephadex G 50 w buforze TE. ^{32}P -DNA, znakowany w wysokim stopniu, wytrąca się stosując 0,1 objętości 2 M octanu sodowego o pH 5,1 i 2,5 objętości etanolu w temperaturze 20°C.

Hybrydyzację powyższej próbki z sączkiem impregnowanym DNA prowadzi się zasadniczo w sposób opisany przez D. Hanabana i M. Meselsona (informacja ustna). Sączki, przygotowane w sposób jak opisano w powyższej części opisu, preinkubuje się w ciągu 2 godzin w temperaturze 68°C w 0,1% Ficoll, 0,1% poliwinylolipirolidonie, 0,1% bydlęcej albuminy surowiczej, 0,15 M NaCl, 0,03 M Tris — HCl o pH 8,0, 1 mM EDTA i przemywa się 0,02% Ficoll, 0,02% poliwinylolipirolidonem, 0,02% bydlęcą albuminą surowiczą, 0,75 M NaCl, 0,15 M Tris — HCl o pH 8,0, 5 mM EDTA i 0,5% SDS. Hybrydyzację prowadzi się przez noc w temperaturze 68°C w roztworze takim samym, jakiego użyto do przemywania (wyżej opisanego), z zastosowaniem próby znakowanej ^{32}P , którą przed użyciem zdenaturowano w temperaturze 100°C przez 5 minut. Sączki po hybrydyzacji przemywa się 2 razy 0,3 M NaCl, 0,06 M Tris — HCl o pH 8,0, 2 mM EDTA w temperaturze 68°C w ciągu 2 godzin przed wysuszeniem na powietrzu, po czym przeprowadza się autoradiografię.

Screeningowi poddaje się około 1350 klonów wywodzących się z klasy DNA wielkości 800—900. 13 kolonii, w tym pHFIF1, daje wynik pozytywny. Klony te oznaczono G-HB101-pHFIF1 do 13, a ich rekombinantowe cząsteczki DNA pHFIF1 do 13. Jeden z tych klonów, pHFIF2, hybrydyzuje się z poli(A) RNA zawierającym mRNA IFN- β i bada przy użyciu DBM-celulozy w postaci bibuły (supra). Ponieważ całkowitą aktywność RNA IFN wykrywa się we frakcji zhybrydyzowanej, a nie zhybrydyzowany RNA nie wykazuje jakiegokolwiek wykrywalnej aktywności, jest oczywiste, że klony identyfikowane przez hybrydyzację w kolonii z częścią fragmentu pHFIF1 hybrydują również z mRNA IFN- β .

Jest, oczywiście, widoczne, że ta metoda screeningu klonów z użyciem wprowadzonego DNA HuIFN- β pHFIF1 lub innego wprowadzanego DNA klonu identyfikowanego za pomocą wprowadzanego DNA pHFIF1, jak wyżej opisano, może być zastosowana równie dobrze do innych klonów zawierających sekwencje DNA otrzymywane przez zastosowanie rekombinantowej technologii DNA, syntezy, naturalnych źródeł lub ich kombinacji, względnie klonów zawierających sekwencje DNA pokrewne jakimkolwiek powyższym sekwencjom DNA przez mutację, w tym pojedynczą lub wielokrotną, podstawienia zasad, insercje, inwersje lub delecje. Tak więc, te sekwencje DNA i ich identyfikacja również są objęte zakresem wynalazku. Należy również rozumieć, że sekwencje DNA, które nie reagowały w screeningu z powyższymi sekwencjami DNA, lecz które w wyniku uszeregowania ich nukleotydów kodują te polipeptydy, które są kodowane przez powyższe sekwencje DNA, również są objęte zakresem wynalazku.

Charakteryzacja rekombinantowych plazmidów odpowiadających IFN- β .

13 klonów (pHFIF1 — 13), wykrytych w wyniku hybrydyzacji w kolonii, charakteryzuje się dalej. Konstruuje się mapę fizyczną fragmentów DNA włączonych do tych klonów i określa się orientację tych fragmentów w różnych klonach.

Mapę fizyczną plazmidów konstruuje się przez trawienie różnymi enzymami restrykcyjnymi (New England Biolabs) w 10 mM Tris — HCl o pH 7,6, 7 mM $MgCl_2$, 7 mM β -merkaptotetanolu w temperaturze 37°C, metodami dobrze znanymi. Produkty trawienia poddaje się elektroforezie w 2,2% żelu agarozowym i 6% żelu poliakrylamidowym w 40 mM Tris — kwas octowy o pH 7,8. 20 mM EDTA. Analizuje się je po uwidocznieniu przez barwienie bromkiem etidium i porównuje ze szczegółową mapą fizyczną pBR322 (J.G. Sutcliffe, supra). Mapy restrykcyjne różnych plazmidów konstruuje się na podstawie tych sposobów zachowania się przy barwieniu. Analizuje się je szczegółowo przez oznaczenie sekwencji fragmentów DNA włączonych do plazmidów, zasadniczo metodą A.M. Maxama i W. Gilberta („A New Method For Sequencing DNA”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560—564 (1977)).

Plazmidowy DNA otrzymuje się z różnych pHFIF1 — 13 zgodnie ze sposobem według wynalazku metodą Kahna i wsp. (supra), którą stosowano w celu izolowania zestawu klonów do screeningu. Izolowany DNA w postaci I oczyszcza się przez wirowanie w obojętnym gradiencie sacharozy jak opisano w powyższej części opisu i trawi różnymi enzymami restrykcyjnymi, zasadniczo jak to poleca dostawca (New England Biolabs).

DNA trawiony enzymami restrykcyjnymi defosforyluje się w temperaturze 65°C w ciągu 30 minut w obecności 4 jednostek bakteryjnej fosfatazy alkalicznej i 0,1% SDS. Po następujących po tym 2 ekstrakcjach fenolem i wytrąceniu etanolem, DNA zostaje w końcu 5' znakowany przy użyciu γ — ^{32}P -ATP (około 3000 Ci/milimol) i kinazy polinukleotydowej (P — L Biochemicals, Inc.).

W celu określenia sekwencji znakowane fragmenty traktuje się na dwa sposoby. Niektóre z nich oczyszcza się na żelu poliakrylamidowym przed rozszczepieniem drugim enzymem restrykcyjnym. Inne rozszczepia się drugim enzymem restrykcyjnym bezpośrednio. W obydwu przypadkach żądane fragmenty wydziela się w żelu poliakrylamidowym w buforze Tris — boran — EDTA. Figura 7 przedstawia różne fragmenty restrykcyjne (kółka oznaczają znakowanie, a strzałki kierunek określania sekwencji) i zastosowaną strategię określania sekwencji z użyciem pHFIF1, pHFIF3, pHFIF6 i pHFIF7.

Fragmenty poddaje się degradacji zgodnie z metodą A.A. Maxama i W. Gilberta (supra). Produkty frakcjonuje się w żelu poliakrylamidowym, w różnych stężeniach i przy różnych długościach w 50 mM Tris — boran, 1 mM EDTA o pH 8,3 przy napięciu 900—2000 V.

Sekwencję każdego odcinka włączonego fragmentu cDNA określa się dla obydwu nici i sekwencji każdego miejsca rozpoznawania enzymów restrykcyjnych, które służy jako znakowanie zakończone, określa się dzieląc na odcinki. Tak otrzymaną kombinowaną sekwencję nukleotydową kodującej nici DNA IFN- β lub genu i odpowiadającą jej sekwencję aminokwasową przedstawiono na figurze 4. Ponieważ żaden z plazmidów pHFIF1 — 13 nie zawierał całkowitego genu HuIFN- β , fig. 4 jest wynikiem kombinacji danych odnoszących się co najmniej do dwóch plazmidów. W tym aspekcie, figura 5 przedstawia zależność wzajemną między włączonymi fragmentami pHFIF1, pHFIF3, pHFIF6 i pHFIF7, przy czym pełne strzałki lub szewrony wskazują orientację różnych części włączonych fragmentów.

Odnosnie do figury 4, heteropolimeryczna część włączanego fragmentu jest zakończona na jednym końcu segmentem bogatym w T' i zakończonym nicią A' (co jest prawdopodobnie odbiciem poliA zakończenia mRNA). Odnosnie włączonego fragmentu — to jest on numerowany od pierwszego nukleotydu całkowitego włączonego fragmentu do nukleotydu w części włączanego fragmentu nie ulegającej translacji. Początkowy tryplet ATG w pozycji 65—67 i tryplet kończący TGA w pozycji 626—628 definiują fazę odczytywania nie przerwana kodonami nonsensownymi. Jakakolwiek inna sekwencja translacji, to jest przy innych fazach odczytywania, ograniczonych przez ATG lub GTG i sygnał zakończenia, jest zbyt krótka, aby kodować polipeptyd o wielkości oczekiwanej dla IFN- β . Tak więc, region między nukleotydem 65 a nukleotydem 625 najprawdopodobniej zawiera sekwencję nukleotydową odpowiadającą kombinowanej sekwencji DNA kodującej IFN- β zgodnie ze sposobem według wynalazku.

Sekwencja ta nie wyklucza możliwości, że modyfikacje genu, takie jak mutacje, w tym pojedyncze lub wielokrotne, podstawienia zasad, delecje, insercje lub inwersje, mogły uprzednio

pojawiać się w genie lub mogą następnie powodować modyfikację jego właściwości lub właściwości polipeptydu powstającego w wyniku translacji. Nie wyklucza się pewnego polimorfizmu, który może dać w efekcie geny lub polipeptydy fizjologicznie podobne, lecz strukturalnie lekko różniące się od przedstawionych na fig. 4 (supra, p. 3). Np. inny klon, zidentyfikowany zgodnie ze sposobem według wynalazku, ma „T” zamiast „C” przy nukleotydzie 90 sekwencji nukleotydowej kodującej IFN- β . Taka zmiana w trzecim nukleotydzie kodonu nie powoduje zmiany w kodowanym aminokwasie. Sekwencja aminokwasowa kodowana przez sekwencję DNA przedstawioną na fig. 4 jest identyczna z sekwencją aminokwasową, o której donosi Taniguchi i wsp. (supra).

Należy rozumieć, że cDNA klonowany z poli(A) RNA zwykłymi metodami (A. Efstratiadis i wsp., supra) może wykazywać brak nukleotydów na zakończeniu 5' i może nawet zawierać sekwencje artefaktowe (R.I. Richards i wsp., „Molecular Cloning And Sequence Analysis Of Adult Chicken β -Globin cDNA”, *Nucleic Acids Research*, 7, 1137—1146 (1979)). Nie jest pewne, że ATG zlokalizowany jako nukleotydy 65—67 jest rzeczywiście pierwszym ATG sekwencji kodującej IFN- β . Tym niemniej, dla celów niniejszego opisu, przyjmuje się, że ATG jako nukleotydy 65—67 jest pierwszym ATG naturalnego mRNA IFN- β .

W porównaniu nukleotydów kodowanych w tym regionie włączonego fragmentu z sekwencją 13 aminokwasów końca aminowego naturalnego ludzkiego interferonu z fibroblastów — Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser — określoną przez Knighta i wsp. (supra) okazuje się, że wybrana faza odczytywania jest prawidłowa i że nukleotydy 65—127 mogą kodować peptyd sygnałowy poprzedzający sekwencję nukleotydową kodującą dojrzały polipeptyd.

Poza tym, w eukariotycznych RNA tryplet AUG pierwszy od zakończenia 5' jest zazwyczaj miejscem inicjacji syntezy białka (M. Kozak, „How Do Eukaryotic Ribosomes Select Initiation Regions In Messenger RNA?”, *Cell*, 15, 1109—1125 (1978)). W niniejszym przypadku, kodon w kombinowanym fragmencie, odpowiadający pierwszemu aminokwasowi interferonu z fibroblastów jest 22 kodonem od pierwszego ATG. To także sugeruje, że sekwencja DNA kodująca interferon z fibroblastów może być poprzedzona sekwencją determinującą polipeptyd sygnałowy składający się z 21 aminokwasów. Przypuszczalna sekwencja sygnałowa zawiera kodony serii hydrofobowych aminokwasów. Taka akumulacja hydrofobowych reszt jest oczywiście charakterystyczna dla sekwencji sygnałowej (B.D. Davis i P.C. Tai, „The Mechanism Of Protein Secretion Across Membranes”, *Nature*, 283, 433—438 (1980)).

Sekwencja nukleotydowa odpowiadająca dojrzałemu HuIFN- β zawiera 498 nukleotydów, kodujących 166 aminokwasów. Zakładając, że nie występuje przetworzenie końca karboksylowego, masa cząsteczkowa polipeptydu odpowiadającego interferonowi wynosi 20085. Skład zasad w sekwencji kodującej odpowiada 45% G + C. Stosowanie kodonów w sekwencji kodującej interferon jest logicznie zgodne z ogólnie obowiązującymi dla mRNA ssaków (R. Grantham i wsp., „Coding Catalog Usage And The Genome Hypothesis”, *Nucleic Acids Research*, 8, 49—62 (1980)). Jakiegokolwiek zaobserwowane odchylenia można przypisać zastosowaniu niewielkich ilości.

Struktura polipeptydu przedstawiona na fig. 4, odpowiadającego złożonemu fragmentowi, oczywiście nie odpowiada strukturze polipeptydu zmodyfikowanej w jakikolwiek sposób z powodu oddziaływania in vivo z enzymami np. przez glikozylację. Tak więc, należy rozumieć, że sekwencja aminokwasowa przedstawiona na fig. 4 może nie być identyczna z Hu IFN- β tworzoną in vivo.

Porównanie pierwszych 13 aminokwasów naturalnego interferonu fibroblastów (Knight i wsp., supra) i sekwencji wywodzącej się z kombinowanego genu na fig. 4 nie wykazuje różnic. Skład aminokwasowy określony bezpośrednio dla naturalnego interferonu fibroblastów z jednej strony, i skład wydedukowany na podstawie sekwencji kombinowanego genu otrzymanego sposobem według wynalazku z drugiej, również wykazują zasadnicze podobieństwo. Figura 6 przedstawia porównanie tych składów.

Aczkolwiek żadna z rekombinantowych cząsteczek DNA początkowo otrzymanych zgodnie ze sposobem według wynalazku nie zawiera całkowitej sekwencji DNA interferonu z fibrobla-

stów, dostarczają one użytecznej próbki do screeningu zbiorów sekwencji DNA dla tych sekwencji, które są pokrewne HuIFN- β . Dalej, kombinacja części włączanych fragmentów DNA tych rekombinantowych cząsteczek DNA daje całkowitą sekwencję IFN- β , która jest, jak to wykazano w poniższej części opisu, zgodna z obecnym stanem wiedzy. Np. w odniesieniu do fig. 5 można łatwo zauważyć, że fragment PstI-BgIII pHFIF6 można połączyć z fragmentem PstI-HaeII pHFIF7 lub fragment EcoRI-PstI pHFIF6 można połączyć z fragmentem Pst-HaeII pHFIF7, względnie fragment BgIII-PstI pHFIF6 można połączyć z fragmentem PstI-BgIII klonu 7 z utworzeniem kombinowanej sekwencji kodującej HuIFN- β . Połączenia tych fragmentów można, oczywiście, dokonać przed lub po insercji klonowanego fragmentu dożądanego plazmidu.

Otrzymywanie plazmidów zawierających całkowitą sekwencję DNA kodującą HuIFN- β w celu ekspresji polipeptydów wykazujących aktywność HuIFN- β .

Bakteriofag λ zawiera dwa silne promotory P_L i P_R , których aktywność znajduje się pod kontrolą represerowego białka, produktu fagowego genu cI . W obecności represora transkrypcja tych promotorów ulega całkowitej represji. Usunięcie represora daje w wyniku silnie wyrażoną transkrypcję P_L i P_R (przegląd patrz, H. Szybalski i W. Szybalski, „A Comprehensive Molecular Map Of Bacteriophage λ ”, *Gene*, 7, 217—270 (1979)).

Pochodne plazmidu pBR322 dającego dużą ilość kopii (F. Bolivar i wsp., „Construction And Characterization Of New Cloning Vehicles. II. A Multiple Cloning System”, *Gene*, 2, 95—113 (1977)) konstruuje się z włączeniem promotora P_L . Plazmidy te opisane są w brytyjskim zgłoszeniu patentowym nr 80 28983, złożonym 8 września 1980 i włączonym do niniejszego opisu jako odnośnik.

A. Struktura plazmidów zawierających promotor P_L .

Plazmid pPLa2311. Plazmid ten, przedstawiony na fig. 8 składa się z 3 fragmentów HaeII. Największy fragment o około 1940 bp zawiera region P_{LOL} bakteriofaga λ i region genu β -laktamazy pBR322 (J. Sutcliffe, „Complete Nucleotide Sequence Of The Escherichia coli Plasmid pBR322”, *Cold Spring Harbor Symposium*, 49, 77—90 (1978)). Sąsiaduje z tym fragmentem fragment HaeII o 370 bp. otrzymany z plazmidu Col E_1 . Miejsce początku replikacji obejmuje połączenie między tymi dwoma fragmentami (A. Oka i wsp., „Nucleotide Sequence Of Small Col E_1 Derivatives. Structure Of The Regions Essential For Autonomous Replication And Colicin E_1 Immunity”, *Mol. Gen. Genet.*, 172, 151—159 (1979)). Trzeci fragment HaeII, o długości około 1600 par zasad koduje oporność na kanamycynę. Fragment ten pierwotnie otrzymuje się z plazmidu pCR₁ (C. Covey i wsp., „A Method For The Detection Of Restriction Sites In Bacterial Plasmid DNA”, *Mol. Gen. Genet.*, 145, 155—158 (1976)). Kierunek transkrypcji od promotora P_L jest taki sam jak w genie β -laktamazy. Plazmid pPLa2311 nadaje oporność na karbenicylinę o stężeniu do 100 μ g/ml i kanamycynę o stężeniu do 50 μ g/ml.

Plazmid G-pPLa8. Plazmid ten, przedstawiony na figurze 9 otrzymuje się z pPLa2311 za pomocą konwersji miejsca PstI w genie β -laktamazy do miejsca BamHI. Dokonuje się tego traktując pPLa2311 otwarty PstI nukleazą S_1 , a następnie łącząc metodą lepkich końców z fragmentem łącznikowym BamHI (otrzymanym z Collaborative Research Inc., Waltham, Mass.), a następnie, po rozszczepieniu BamHI przywracając cząsteczkę do postaci kolistej. Plazmid pPLa8 nie przenosi dalej oporności na karbenicylinę, chociaż w dalszym ciągu nadaje oporność na kanamycynę.

Plazmid G-pPLc24. Plazmid ten, przedstawiony na figurze 10, zawiera gen β -laktamazy i miejsce początku replikacji z pBR322. Region HaeII-EcoRI o 290 bp zawiera region P_{LOL} z bakteriofaga λ . Kierunek transkrypcji: od promotora P_L ku miejscu EcoRI. Fragment EcoRI — BamHI o 431 bp koduje miejsce przyłączania rybosomów i pierwsze 98 reszt aminokwasowych genu replikazy bakteriofaga MS2. Fragment otrzymany jest z plazmidu pMS2—7 (R. Devos i wsp., „Construction And Characterization Of A Plazmid Containing A Nearly Fullsize DNA Copy Of Bacteriophage MS2 RNA”, *J. Mol. Biol.*, 128, 595—619 (1979)). Translacja białka replikazy MS2 przebiega kolinearnie z transkrypcją od promotora P_L .

B. Zależne od temperatury włączenie aktywności promotora P_L .

Transkrypcja od promotora P_L , obecnego w plazmidach pPLa2311, pPLa8 i pPLc24, ulega represji przy przetrzymywaniu plazmidów w szczepie *E. coli*, który syntetyzuje białko represora. Wskutek jego samoregulacyjnego sposobu syntezy, jedna kopia genu *cI* na chromosomie lizogennego szczepu zdolna jest do pełnego wywoływania represji promotora P_L obecnego w plazmidzie dającym wiele kopii (M. Ptashne i wsp., „Autoregulation And Function Of A Repressor In Bacteriophage λ ”, *Science*, **194**, 156—161 (1976)).

Szczepami zastosowanymi w sposobie według wynalazku są: *E. coli* K12 Δ HI (K12 M72 $\text{lac}_{am}\Delta\text{trpEA2 Sm}^R$ (λ cI857 $N_{am}7N_{am}5$ 3 Δ HI bio) (U. Bernard i wsp., „Construction Of Plasmid Cloning Vehicles That Promote Gene Expression From The Bacteriophage λP_L Promoter”, *Gene*, **5** 59—76 (1979)) i *E. coli* M5219 (K12 M72 $\text{lac}_{am}\text{trp}_{am}\text{SM}^R$ (λ cI857 Δ HI bio 252)(H. Greer, „The *cI* Gene Of Bacteriophage λ ”, *Virology*, **66**, 589—604 (1975)). Obydwa szczepy są siedlikiem defektywnego, niepobudliwego profaga λ , zawierającego zmutowany gen *cI*. Zmutowany gen koduje wrażliwy na temperaturę represor, co pozwala włączać transkrypcję od promotora P_L przez zmianę temperatury, przy czym w 28°C represor jest aktywny i wywołuje represję transkrypcji od promotora P_L , lecz w temperaturze 42°C represor jest inaktywowany i transkrypcja z promotora P_L zostaje włączona.

Delecja Δ HI w profagu usuwa część genu *cro* i wszystkie inne geny w prawo od *cro* (M. Castellazzi i wsp., „Isolation And Characterization Of Deletions In Bacteriophage λ Residing As Prophage I *E. coli* K12”, *Mol. Gen. Genet.*, **117**, 211—218 (1972)). Delecja genu *cro* jest korzystna, ponieważ wiadomo, że akumulacja białka *cro* powoduje represję transkrypcji od promotora P_L (A. Johnson i wsp., „Mechanism Of Action Of The *cro* Protein Of Bacteriophage λ ”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 1783—1787 (1978)). W szczepie M5219 dodatkowo występuje delecja bio252, która usuwa wszystkie geny na lewo od *cIII*, włącznie z *cil*.

Pod wpływem indukcji temperaturowej szczep M5219 wykazuje ekspresję produktu genu funkcyjnego *N*. Z drugiej strony szczep K12 Δ HI wykazuje dwie mutacje „amber” w *N*, co czyni szczep ten funkcjonalnie *N*-ujemnym. Wiadomo, że produkt genu *N* działa w bakteriofagu λ jako antyterminator (J.W. Roberts, „Transcription Termination And Late Control In Phage λ ”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3300—3304 (1975)). Wpływ antyterminatora obserwuje się w równym stopniu w przypadku sekwencji terminatora, które nie są naturalnie obecne w DNA faga λ (np. naturalny sygnał stop przy końcu operonu *trp*) zapewniając rozpoczynanie się transkryptu RNA od promotora P_L . Oprócz tego, wpływy polaryzujące spowodowane obecnością nonsensownego kodonu w transkrypcie P_L są złagodzone przez działanie białka genu *N* (przegląd patrz: N. Franklin i C. Yanofsky, „The *N* Protein Of λ : Evidence Bearing On Transcription Termination, Polarity And The Alteration Of *E. coli* RNA Polymerase” w: *RNA Polymerase* (Cold Spring Harbor Laboratory, 1976, str. 693—706).

Tak więc, dysponowanie wyżej wspomnianymi plazmidami w indukowanym termicznie podłożu bakteryjnym *cI* pozwala na włączanie i wyłączanie aktywności promotora P_L . Wybór K12 Δ HI lub M5219 pozwala transkrypcji zachodzić zarówno w nieobecności, jak i w obecności produktu genu *N*. To ostatnie może być korzystne, jak opisano w powyższej części opisu, w przypadkach, gdy regiony DNA, które mają być transkrybowane, zawierają sekwencje podobne do terminatora transkrypcji lub sekwencji spowalniające działanie polimerazy RNA.

C. Konstruowanie klonów zawierających sekwencję DNA kodującą $\text{HuIFN-}\beta$ włączoną do plazmidu zawierającego promotor P_L . W następującym dalej opisie, izolowanie plazmidowego DNA, analizę restrykcyjną DNA i łączenie fragmentów DNA przeprowadza się jak wyżej opisano w przypadku klonowania dwuniciowego DNA. Stadium transformacji prowadzi się również, jak wyżej opisano, z tym wyjątkiem, że w przypadku, gdy stosuje się szczep K12 Δ HI lub M5219 jako szczep-gospodarz, wstrząsu cieplnego dokonuje się w temperaturze 34°C w ciągu 5 minut, a komórki transformowane inkubuje się w temperaturze 28°C.

1. Konstruowanie plazmidu G-pPLa-HFIF-67-1.

Uzasadnieniem tej konstrukcji jest obserwacja, że kombinacja odpowiednich fragmentów restrykcyjnych z klonów G-pBR322 (Pst)/HFIF-6 i G-pBR322(Pst)/HFIF-7 umożliwia rekonstrukcję całkowitej, kodującej w sposób ciągły, sekwencji $\text{IFN-}\beta$. Przechodzenie otrzymanych

fragmentów przez kilka stadiów konstrukcyjnych przedstawiono schematycznie na fig. 8. Plazmid G-pBR322(Pst)/HFIF-6 rozszczepia się EcoRI i PstI i łączy z plazmidem G-pBR322(Pst)/HFIF-7, który również został rozszczepiony PstI i PvuI. Połączeniu mieszaninę trawi się EcoRI i HaeII. Używa się 4-krotnego nadmiaru molowego tej mieszaniny do łączenia z plazmidem G-pPLa2311, który trawiony był HaeII i EcoRI. Transformanty otrzymuje się w szczepie C600 r_{km}^+ (λ) (który został użyty z powodu jego względnie wysokiej podatności na transformację i ponieważ zawiera on gen *cI* typu dzikiego) przez selekcję pod względem oporności na kanamycynę. Z 15 transformantów poddanych screeningowi, 2 utraciły oporność na karbenicylinę. Restrykcyjna analiza DNA izolowanego z plazmidów tych transformantów ujawniła, że jeden miał pożądaną strukturę G-pPLa-HFIF-67-1 uwidocznioną na fig. 8. Plazmid ten zawiera pojedyncze miejsce EcoRI i pojedyncze miejsce PstI. Połączone trawienie EcoRI — PstI daje dwa fragmenty, przy czym mniejszy z nich migruje wspólnie z fragmentem otrzymanym po rozszczepieniu G-pBR322(Pst)/HFIF-6 przez EcoRI — PstI. Trawienie BgIII odszczepia mały fragment o około 650 bp. Wielkość tego ostatniego fragmentu jest zgodna z oczekiwaną wielkością po połączeniu najbliższego fragmentu BgIII — PstI klonu G-pBR322(Pst)/HFIF-6 z dalszą częścią fragmentu PstI — BgIII G-pBR322(Pst)/HFIF-7. Trawienie HincII tworzy trzy fragmenty, jak można oczekiwać na podstawie obecności miejsc HincII w regionie P_L , aminowej części końcowej genu β -laktamazy i nie ulegającym translacji końcu 5' sekwencji DNA HuIFN- β . Plazmid ten oznaczono G-pPLa-HFIF-67-1.

Na podstawie powyższej charakterystyki za pomocą analizy enzymami restrykcyjnymi, plazmid G-pPLa-HFIF-67-1 powinien zawierać całkowitą sekwencję kodującą HuIFN- β . Kierunek żądanej transkrypcji jest kolinearny z transkrypcją od promotora P_L . Między P_L i sekwencją genu kodującego HuIFN- β , plazmid w dalszym ciągu zawiera zakończenie poli(A.T) i odwrotny fragment końca 3', jak w G-pBR322 (Pst)HF F-6

2. Konstruowanie plazmidu G-pPLa-HFIF-67-12.

Następne stadium konstruowania plazmidu przeznaczone jest na usuwanie z G-pPLa-HFIF-67-1 zakończenia poli(A.T) i części odwróconego fragmentu końca 3' (patrz fig. 9). DNA G-pPLa-HFIF-67-1 rozszczepia się BgIII i HpaII. Ponieważ sekwencja kodująca HuIFN- β nie zawiera miejsc HpaII, ten sposób postępowania daje w wyniku fragment BgIII zawierający nie naruszoną sekwencję kodującą IFN- β i jednocześnie inaktywuje pozostałą część wektora. Powstały fragment BgIII łączy się z plazmidem G-pPLa8, który został strawiony BamHI. Enzymy BgIII i BamHI tworzą identycznie ułożone końce tak, że końce BgIII można łączyć z otwartym miejscem BamHI i odwrotnie. Zrekonstruowane miejsce nie jest dłuższym substratem BgIII lub BamHI, lecz jest rozpoznawane przez enzym Sau3AI (MboI) (V. Pirotta, „Two Restriction Endonucleases From *Bacillus globigii*”, *Nucleic Acids Res.*, 3, 1747—1760 (1976)). Po połączeniu mieszaninę ponownie rozszczepia się BamHI w celu wyeliminowania tych cząsteczek G-pPLa8, które uległy pojedynczemu przywróceniu postaci kolistej. Transformanty ponownie otrzymuje się w C600 r_{km}^+ (λ) selekcionowanym pod względem oporności na kanamycynę.

Transformanty poddaje się screeningowi przez oznaczenie wielkości nie rozszczepionego DNA w żelu agarozowym jak opisano w powyższej części opisu, w celu charakterystyki rekombinantowych plazmidów odpowiadających IFN- β . Klony nieznacznie większe od macierzystego G-pPLa8 poddaje się później analizie restrykcyjnej z użyciem albo PstI albo HincII. Stwierdzono, że jeden klon zawiera pojedyncze miejsce PstI i trzy miejsca HincII. Jeden fragment z tego klonu migruje wspólnie z fragmentem HincII pPLa8 otrzymanym z regionu od P_L do regionu β -laktamazy. Inny mały fragment klonu mierzący około 400 bp, zgodny jest z insercją fragmentu BgIII do G-pPLa8 w sensie orientacji w odniesieniu do promotora P_L . Plazmid ten oznaczono G-pPLa-HFIF-67-12. Stadia konstruowania tego plazmidu przedstawione są schematycznie na fig. 9. Bardziej szczegółowo mapę tego plazmidu przedstawia figura 11. Wielkość plazmidu (około 4450 bp) została oznaczona na podstawie składających się na niego fragmentów, które z kolei oznaczono na podstawie ich względnej ruchliwości w żelach agarozowych.

E. coli K12 Δ HI i M5219 transformuje się następnie scharakteryzowanym plazmidem G-pPLa-HFIF-67-12.

Przegląd oznaczonej sekwencji nukleotydowej w okolicy połączenia BgIII/BamHI w G-pPLa-HFIF-67-12 ujawnia interesującą cechę. Polipeptyd inicjowany przy sekwencji AUG kodującej β -laktamazę tego plazmidu kończy się przy podwójnym kodonie „amber” zlokalizowanym w nie ulegającym translacji końcu 5' sekwencji HuIFN- β . Te kodony zakończenia są zlokalizowane 23 nukleotydy przed inicjującym AUG sygnałowego peptydu HuIFN- β , to jest:

181* Połączenie BamHI/BgIII

CCC.CGG.AUC.UUC.AGU.UUC.GGA.GGC.AAC.CUU.UCG.AAG.CCU.

Pro-Arg-Ile-Phe-Ser-Phe-Gly-Gly-Asn-Leu-Ser-Lys-Pro-

UUG.CUC.UGG.CAC.AAC.AGG.UAG.UAG. GCGACACUGUUCGUGUUGUCAAC

Leu-Leu-Trp-Asn-Arg am am

AUG (sekwencja kodująca peptyd sygnałowy HuIFN- β) — AUG — (sekwencja kodująca dojrzały HuIFN- β).

Figura zamknięta w prostokącie odpowiada numerom reszt aminokwasowych białka β -laktamazy pBR322 (J. Sutcliffe, supra). Gwiazdka (*) wskazuje, że kodon CCU obecny w tej pozycji w pBR322 został zmieniony na CCC w wyniku konwersji miejsca PstI w pPLa2311 do miejsca BamHI w pPLa8 (patrz wyżej).

Tak więc, konstrukcja ta otwiera możliwość reinicjacji przy AUG sygnałowego peptydu HuIFN- β , a przez to możliwość ekspresji IFN- β połączonego z jego peptydem sygnałowym, ale nie połączonego z częścią β -laktamazy. Taką wewnętrzną preinicjację z następującym przedwczesnym zakończeniem obserwowano w genie represorowym operonu laktozowego *E. coli* (T. Platt i wsp., „Translational Restarts: AUG Reinitiation Of A lac Repressor Fragment”, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 897—901 (1972)). Konstrukcja ta umożliwiałaby wydzielanie dojrzałego HuIFN- β przez prawidłowe bakteryjnie rozpoznanie sygnałowej sekwencji HuIFN- β .

3. Konstruowanie plazmidu G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19.

Ze znanej sekwencji pBR322 i sekwencji kodującej HuIFN- β można wydedukować, że delekcja z G-pPLa-HFIF-67-12 małego fragmentu HincII (z regionu wewnątrz β -laktamazy do 3 nukleotydów przed AUG inicjującym sygnałowy peptyd HuIFN- β) daje w wyniku ciągłą translację, przy czym faza odczytywania zaczyna się od AUG β -laktamazy i kończy się po sekwencji kodującej HuIFN- β . Konstrukcja ta jest więc przewidziana do kodowania polipeptydu składającego się z 82 reszt aminokwasowych z sekwencji kodującej β -laktamazę, jednego aminokwasu kodowanego w połączonym miejscu HincII, sygnałowego peptydu HuIFN- β i dojrzałego HuIFN- β , to jest:

82

GUU.AAC.AUG—(sekwencja kodująca sygnałowy peptyd HuIFN- β) -AUG—

Val-Asn-Met (sekwencja kodująca dojrzały HuIFN- β)

Figura zamknięta w prostokącie odpowiada numerowi reszty aminokwasowej w białku β -laktamazy pBR322 (J. Sutcliffe, supra). Tak więc, konstrukcja ta może umożliwić ekspresję połączonego polipeptydu składającego się z części β -laktamazy połączonej jednym aminokwasem z sygnałowym peptydem HuIFN- β , który z kolei połączony jest z dojrzałym HuIFN- β . To połączone białko można wydzielić z komórki.

G-pPLa-HFIF-67-12 trawi się częściowo HincII. Po połączeniu (przy stężeniu DNA wynoszącym około 0,01 μ g/ml), DNA rozszczepia się XorII, izoschizomerem PvuI tworzącym wystające końce 3' (R. Wang i wsp., Biochem. Biophys. Acta, w druku) i łączy ponownie przy niskim stężeniu DNA. Macierzysty G-pPLa-HFIF-67-12 zawiera dwa miejsca XorII: jedno miejsce inaktywuje gen kanamycyny, a drugie jest zlokalizowane we fragmencie HincII do delekcji z plazmidu. Celem stadium: trawienie XorII — ponowne połączenie jest eliminacja macierzystych cząsteczek DNA nie rozszczepionych enzymem HincII. Te cząsteczki mają dwa miejsca XorII i w warunkach zastosowanych przy łączeniu, połączenie ponowne jest w wysokim stopniu nieprawdopodobne. Transformanty otrzymuje się w C600r⁺km⁺k (λ) selekcionując pod względem oporności na kanamycynę i poddaje screeningowi przez analizę restrykcyjną w celu ustalenia obecności pojedynczego miejsca PvuI. Dalszą analizę klonów prowadzi się za pomocą trawienia HincII. Jeden klon tracący najmniejszy fragment HincII, lecz z drugiej strony identyczny z G-pPLa-HFIF-67-

-12 oznaczono G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19. Stadia występujące w konstrukcji tego plazmidu przedstawiono schematycznie na fig. 9. Bardziej szczegółowo mapę tego plazmidu przedstawiono na fig. 12. Wielkość plazmidu (około 4050 bp) oznaczono przez scalenie wielkości fragmentów stanowiących jego składniki, które z kolei oznaczono przez ich względną ruchliwość w elektroforezie na żelach agarozowych. Następnie *E. coli* K12 Δ HI i M5219 transformuje się scharakteryzowanym plazmidem G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19.

4. Konstruowanie plazmidu G-pPLc-HFIF-67-8.

Plazmid G-pPLc24 daje inną możliwość insercji sekwencji HuIFN- β w ten sposób, że inny połączony peptyd może potencjalnie być syntetyzowany. Insercja fragmentu BgIII z G-pPLa-HFIF-67-1 w miejscu BamHI G-pPLc24 daje w wyniku, przy kontynuowanej fazie odczytywania, kodowanie 98 reszt aminokwasowych genu replikazy MS2 (W. Fiers i wsp., „Complete Nucleotide Sequence Of Bacteriophage MS2 RNA: Primary And Secondary Structure Of The Replicase Gene”, *Nature*, **260**, 500—507 (1976)), 27 aminokwasów kodowanych przez sekwencję między miejscem BgIII a inicjującym AUG sygnałowej sekwencji HuIFN- β , następnie sygnałowego peptydu HuIFN- β i dojrzałego HuIFN- β , to jest:

98

UGG.GAU.CUU.CAG.UUU.CGG.AGG.CAA.CCU.UUC.GAA.GCC.UUU.GCU.CUG.GCA.
Trp-Asp-Leu-Gln-Phe-Arg-Arg-Gln-Pro-Phe-Glu-Ala-Phe-Ala-Leu-Ala-
CAA.CAG.GUA.GUA.GGC.GAC.ACU.GUU.CHU.GUU.GUC.AAC.AUG — (sekwencja
Gln-Gln-Val-Val-Gly-Asp-Thr-Val-Arg-Val-Val-Asn-Met

kodująca sygnałowy peptyd HuIFN- β) — AUG — (sekwencja kodująca dojrzały HuIFN- β).

Figura zamknięta w prostokącie odpowiada numerowi reszty aminokwasowej w białku kodowanym przez gen replikazy MS2 (R. Devos i wsp., supra, W. Fiers, supra). To też, konstrukcja ta pozwala na ekspresję połączonego polipeptydu składającego się z części replikazy MS2, połączonej 27 aminokwasami z sygnałowym peptydem HuIFN- β , który z kolei połączony jest z dojrzałym HuIFN- β .

DNA G-pPLa-HFIF-67-1 trawi się BgIII i łączy z rozszczepionym BamHI DNA pPLc24. Po połączeniu mieszaninę ponownie nacina się BamHI w celu wyeliminowania macierzystych cząstek pPLc24 i przenosi w celu transformacji do C600r^{km} (λ) z selekcją pod względem oporności na karbenicylinę. Transformanty analizuje się przez restrykcję działaniem HincII. Na podstawie znanej pozycji miejsc restrykcyjnych w pPLc24 można przewidzieć, że insercja fragmentu BgIII-IFN- β w orientacji prawidłowej w odniesieniu do P_L daje w wyniku dodatkowy fragment HincII o około 650 bp. Reprezentatywny klon o tej konfiguracji oznaczono pPLc-HFIF-67-8. Stadia konstrukcji tego plazmidu są przedstawione schematycznie na fig. 10. Bardziej szczegółową mapę tego plazmidu przedstawiono na fig. 13. Wielkość plazmidu (około 3850 bp) oznaczono przez scalenie wielkości fragmentów stanowiących jego składniki, które z kolei zostały oznaczone na podstawie względnej ruchliwości podczas elektroforezy w żelach agarozowych. *E. coli* K12 Δ HI i M5219 transformuje się scharakteryzowanym plazmidem G-pPLc-HFIF-67-8.

5. Konstruowanie plazmidu G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 279T.

Plazmid pKT279 (otrzymany od K. Talmadge, pKT279 jest pochodną pB322 z delecją części genu β -laktamazy, z miejscem PstI skonstruowanym przy 4 aminokwasie β -laktamazy) poddaje się trawieniu PstI, po czym wydłużenie na końcu 3' usuwa się z utworzeniem, pod wpływem polimerazy DNA I *E. coli*, w nieobecności dezoksynukleotydofosforanów, fragmentu z wolnym zakończeniem (fragment Klenowa). Fragment PstI DNA pKT279 w postaci linearnej, z wolnym zakończeniem 3', trawi się następnie EcoRI z wytworzeniem fragmentu, który, między innymi, koduje sygnałową sekwencję β -laktamazy i pierwsze 4 aminokwasy dojrzałego białka.

Tego małego fragmentu używa się następnie do zastąpienia fragmentu HpaI — EcoRI pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 (miejsce HpaI jest konsekwencją opisaną w powyższej części opisu delecji z G-pPLa-HFIF-67-12) przez łączenie tego fragmentu z pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 poddanym działaniu HpaI — EcoRI w obecności ligazy DNA T4.

Przewidywaną sekwencją połączenia PstI (z wolnym zakończeniem) — HpaI jest: (sekwencja kodująca sygnałowy peptyd β -laktamazy)-CAC.CGC.AAC.His-Arg-Asn-AUG — (sekwencja

kodująca sygnałowy peptyd HuIFN- β) — AUG — Met (sekwencja kodująca dojrzały HuIFN- β).

W konsekwencji, wynikiem konstrukcji jest IFN- β poprzedzony dwiema sekwencjami sygnałowymi w tandemie, to znaczy bakteryjną sekwencją sygnałową (β -laktamazy) i sekwencją sygnałową IFN- β połączonymi kilkoma aminokwasami. Tak więc, konstrukcja ta pozwala na ekspresję dojrzałego HuIFN- β połączonego z dwoma sygnałowymi peptydami czyli tandemowym połączeniem bakteryjnej sekwencji sygnałowej i sekwencji sygnałowej HuIFN- β . Konstrukcja ta jest rozpoznawana przez bakterię i prawidłowo rozszczepiana. Pozwala ona na ekspresję dojrzałego HuIFN- β i jego wydzielanie z komórki.

E. coli M5219 transformuje się pPLa-HFIF-67-12 Δ 279T.

6. Konstruowanie plazmidu G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 218M1.

Plazmid pKT218 (otrzymany od K. Talmadge, pKT218 jest pochodną pBR322 z delecją części genu β -laktamazy i jej sygnałowej sekwencji, z miejscem PstI skonstruowanym przy 4 aminokwasie sekwencji sygnałowej β -laktamazy) trawi się EcoRI i AluI z utworzeniem fragmentu kodującego między innymi początkową część sygnałowego peptydu β -laktamazy. Fragment ten łączy się w obecności ligazy DNA T 4 z fragmentem otrzymanym z pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 przez trawienie AluI w obecności aktynomycyny D (0,05 mM) (w celu restrykcyjnego przecięcia plazmidu w miejscu AluI w sygnałowym peptydzie IFN- β) i działanie restrykcyjne EcoRI.

Powstały plazmid, oznaczony pPLa-HFIF-67-12 Δ 218M1, zawiera początkową część genu kodującego sygnałowy peptyd β -laktamazy, część genu kodującego sygnałowy peptyd HuIFN- β i gen kodujący dojrzały HuIFN- β . Przewidywaną sekwencją odnośnego regionu plazmid jest:

4

CAA.GCU.CUU.UCC.AUG — sekwencja kodująca dojrzały HuIFN- β

Gln-Ala-Leu-Ser-Met-

Figura zamknięta w prostokącie odpowiada numerowi reszty aminokwasowej sygnałowego peptydu β -laktamazy pKT218. Tak więc, konstrukcja ta może pozwolić na ekspresję dojrzałego HuIFN- β połączonego z częścią bakteryjnej sekwencji sygnałowej i częścią jego własnej sekwencji sygnałowej. Jeśli gospodarz bakteryjny rozpoznaje i prawidłowo rozszczepia tandemowe sekwencje sygnałowe, może zachodzić ekspresja plazmidu z wydzielaniem białka z komórki.

E. coli M5219 transformuje się pPLa-HFIF-67-12 Δ 218M1.

7. Konstruowanie plazmidu G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1.

Plazmidowi pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 nadaje się postać linearną jak poprzednio za pomocą AluI w obecności aktynomycyny D (0,05 M) w celu przecięcia w miejscu AluI w sygnałowym peptydzie HuIFN- β . Po strawieniu HpaI, DNA przywraca się postać kolistą w obecności ligazy DNA T 4. Utworzony w wyniku tego plazmid, oznaczony pPLa-HFIF-67-12 Δ M1, zawiera jedynie niewielką część sekwencji sygnałowej IFN- β poprzedzającej DNA kodujący dojrzały IFN- β .

Przewidywaną sekwencją połączenia jest:

82

GUU.CUC.UUU.CCA.UGA.

Val-Leu-Phe-Pro-STOP

AUG — (sekwencja kodująca dojrzały HuIFN- β)

Figura zamknięta w prostokącie ustawionym pionowo odpowiada numerowi reszty aminokwasowej w β -laktamazie. Figura zamknięta w prostokącie ustawionym poziomo odpowiada sekwencji w drugiej fazie odczytywania. Tak więc, translacja sekwencji kodującej β -laktamazy i pozostała część sekwencji kodującej sygnałowy peptyd IFN- β jest zatrzymana na kodonie stop-UGA. Tym niemniej, kodon start (AUG) dla dojrzałego IFN- β jest obecny w tym samym miejscu, chociaż w innej fazie odczytywania. Tak więc reinicjacja translacji może mieć miejsce w tym punkcie z utworzeniem dojrzałego HuIFN- β .

E. coli M5219 transformuje się pPLa-HFIF-67-12 Δ M1.

8. Konstruowanie plazmidu G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2.

Plazmidowi pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 nadaje się postać linearną za pomocą HpaI i traktuje egzonukleazą BAL 31 w celu usunięcia bp stopniowo od końca fragmentu DNA, któremu na-

dano postać linearną (H. Gray i wsp., „Extracellular Nucleases Of *Pseudomonas* Bal 31”. I. Characterization Of Single Strand-Specific Deoxyribendonuclease”, *Nucleic Acids Res.* 2, 1459—1492 (1975). Zmieniając czas trwania i warunki traktowania egzonukleazą konstruuje się serie fragmentów DNA o różnej ilości nukleotydów, z sekwencji kodujących sygnałowy peptyd HuIFN- β , poprzedzających kodon AUG dojrzałego HuIFN- β lub bez poprzedzających nukleotydów. Tymi fragmentami można później manipulować w celu skonstruowania miejsc wiążących rybosomy w różnej odległości od kodonu start i do otrzymywania żądanej struktury drugorzędowej blisko tego kodonu w celu wzmożenia ekspresji dojrzałego HuIFN- β .

Fragmenty traktowane egzonukleazą otrzymuje się jako fragmenty z wolnymi końcami za pomocą polimerazy DNA I z *E. coli* (fragment Klenowa) w obecności dATP i dGTP w celu uzupełnienia jakichkolwiek wystających końców 5'. Następnie, do fragmentów DNA o wolnych końcach łączy się dwuniciowy łącznik XhoI o sekwencji 5'-CCTCGAGG-3' (Collaborative Research). Fragmenty te następnie przedłuża się dwuniciowym łącznikiem EcoRI o sekwencji 5'-CCGAAT-TCGG-3' (Collaborative Research). Po trawieniu EcoRI, fragmentom mającym lepsze końce EcoRI nadaje znowu postać kolistą za pomocą ligazy DNA z *E. coli*. Użycie tej ligazy zamiast ligazy DNA T 4 pozwala uniknąć nadania znowu postaci kolistej fragmentom o wolnych końcach.

Jeden z plazmidów wyselekcjonowano i oznaczono pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2. Zawiera on miejsce XhoI około 25 bp przed kodonem start AUG dojrzałego HuIFN- β . Miejsce XhoI jest również poprzedzone miejscem EcoRI tworzonym przez przyłączenie łącznika EcoRI fragmentu HpaI do miejsca EcoRI bezpośrednio poprzedzającego promotor P_L w pPLa-HFIF-67-12 Δ 19. Tak więc sekwencja kodująca β -laktamazę ulega delecji. Dalej, ponieważ przynajmniej część sygnałowej sekwencji HuIFN- β zostaje usunięta, możliwa jest ekspresja tylko dojrzałego HuIFN- β .

E. coli K12 Δ HI transformuje się pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2.

Izolowanie i charakteryzowanie HuIFN- β wytworzonego przez bakterie.

A. Otrzymywanie ekstraktów bakteryjnych.

1. Indukowanie. Próbkę hodowli macierzystej (zamrożonej do temperatury -80°C w: 50% gliceryna — 50% podłoże LB) takiej jak wyżej opisane hodowle szczepów K12 Δ HI i M5219 transformowanych plazmidami zawierającymi fragmenty kodujące IFN- β wprowadza się do świeżego podłoża LB z żądanym antybiotykiem i prowadzi hodowlę do nasycenia w temperaturze 28°C . Do dwóch 500 ml porcji podłoża LB bez antybiotyku wprowadza się po 1 ml nasyconych komórek i prowadzi hodowlę ze starannym wstrząsaniem w temperaturze do 28°C do gęstości komórek $2 \times 10^8/\text{ml}$. Jedną porcję przenosi się do otoczenia o temperaturze 42°C w dalszym ciągu wstrząsając. Zależnie od użytego plazmidu, dokonuje się zbioru hodowanych komórek w różnym czasie od przeniesienia do otoczenia o temperaturze 42°C . Kontrolną hodowlę pozostawia się w temperaturze 28°C i dokonuje się jej zbioru w tym samym czasie, co hodowli w temperaturze 42°C . Komórki zbiera się przez odwirowanie przy 8000 obr/min przez 10 minut w wirniku GSA (Sorvall). Osadzone komórki przemywa się 20 ml 50 mM Tris — HCl o pH 7,4, 30 mM NaCl i osadza ponownie przez wirowanie przy 10 000 obr/min w ciągu 10 minut w wirniku SS34 (Sorvall). Osadzone komórki szybko zamraża się w mieszaninie suchego lodu i metanolu i przechowuje w temperaturze -80°C . W przypadku, gdy pożądane jest poddanie zebranych komórek wstrząsowi osmotycznemu, omija się stadium zamrażania.

Stosuje się dwa różne sposoby dokonywania lizy bakterii i ekstrakcji.

2. Ekstrakcja.

Liza A. Komórki zawiesza się ponownie w końcowej objętości 4 ml buforu opisanego w powyższej części opisu i dodaje lizozym (Sigma) do 1 mg/ml. Prowadzi się inkubację w ciągu 30 minut w temperaturze 0°C . Zawiesinę poddaje się zamrażaniu i odmrażaniu w dwóch cyklach przez naprzemienne zanurzanie w mieszaninie etanolu i CO_2 (-80°C) i w łaźni wodnej o temperaturze 37°C . Frakcję S—100 otrzymuje się przez ultrawirowanie bakterii poddanych lizie (4 ml) przy 60 000 obr/min w temperaturze 4°C w ciągu 1 godziny w wirniku SW60 Ti, po czym supernatantu używa się w dalszym toku postępowania.

Liza B. Lizy B dokonuje się w sposób jak wyżej opisano (Liza A), z tą różnicą, że zamiast roztworu 50 mM Tris — HCl (pH 8,0) — 30 mM NaCl stosuje się 50 mM HEPES (Sigma) — NaOH (pH, 7,0), 30 mM NaCl, 3 mM β -merkaptioetanol i 3% surowicę nowonarodzonych cieląt (Gibco).

Wstrząs osmotyczny. Bezpośrednio po zebraniu i przemyciu osadzone komórki zawiesza się ponownie w 20% sacharozie, 100 mM EDTA, 100 mM Tris — HCl o pH 7,4 przy maksymalnej gęstości komórek 1×10^{10} /ml. Zawiesinę przetrzymuje się na lodzie w ciągu 10 minut, a następnie wiruje przy 10 000 obr/min w ciągu 10 minut w wirniku Sorvall SS34. Roztwór sacharozy ostrożnie odciąga się z probówki, po czym osad ponownie zawiesza w równej objętości wody (gęstość komórek 1×10^{10} /ml). Ponownie zawieszone komórki pozostawia się na lodzie na 10 minut i ponownie poddaje wirowaniu przy 10 000 obr/min w ciągu 10 minut w wirniku SS34 (Sorvall). Do supernatantu dodaje się płodową surowicę cielęcą do stężenia 3%, bufor HEPES o pH 7,0 do 50 mM, NaCl do 30 mM i β -merkaptioetanol do 3 mM. Supernatant ten oznacza się jako „supernatant po wstrząsie osmotycznym” i przechowuje w temperaturze 0°C.

3. Wytrącanie siarczanem amonu. Do 0,5 ml roztworu kontrolnego lub ekstraktu S-100 dodaje się 1 ml roztworu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ nasyczonego w temperaturze pokojowej. Mieszaninę tę trzyma się na lodzie przez co najmniej 30 minut, a następnie osadza osad wirując w wirówce Eppendorfa w ciągu 10 minut w temperaturze pokojowej. Osad rozpuszcza się ponownie w PBS (fizjologiczny roztwór soli buforowany fosforanami).

B. Miareczkowanie interferonem.

1. Bezpośrednie badanie aktywności przeciwwirusowej. HuIFN- β bada się w płytkach do mikromiareczkowania (Sterilin) metodą zahamowania CPE (wpływ cytopatyczny) w ludzkich fibroblastach trisomicznych w odniesieniu do chromosomu 21. Komórki wysiewa się na 1 dzień przed użyciem, inkubuje z seryjnymi rozcieńczeniami ($\log_{10} = 0,5$) próbki przez 24 godziny i działa na nie wirusem pęcherzykowatego zapalenia jamy ustnej (szczep Indiana) w rozcieńczeniu 10^{-3} płynu zawiesiny macierzystej zawierającej $10^{6,9}$ mysich (C-929) jednostek tworzących łysinki/ml. CPE rejestruje się po 24 godzinach od podziałania wirusem i punkt końcowy działania interferonu ustala się jako rozcieńczenie próbki powodujące 50% zmniejszenie wirusowego CPE. We wszystkich badaniach stosuje się wewnętrzny standard HuIFN- β , który kalibruje się wobec ludzkiego odnośnika fibroblastowego NIH Go23-902-527.

Linie komórkową trisomiczną wobec chromosomu 21 (w niniejszym opisie nazywaną T₂₁) otrzymuje się przez biopsję skóry pacjentki z zespołem Down'a. Jej kariotyp był ustalony i wykazywał diploidalność w odniesieniu do wszystkich chromosomów z wyjątkiem chromosomu 21 (trisomiczny). Okazało się, że wrażliwość tej linii komórkowej na interferon jest porównywalna z wrażliwością linii komórkowych trisomicznych w odniesieniu do chromosomu 21 opisanych przez E. De Clercq'a i wsp., („Non-antiviral Activities Of Interferon Are Not Controlled By Chromosome 21”, *Nature*, **256**, 132—134 (1975)), oraz E. De Clercq'a i wsp., („Chromosome 21 Does Not Code For An Interferon Receptor”, *Nature*, **264**, 249—251 (1976)).

W innych badaniach używa się linii komórkowej E₁SM (A. Billiau i wsp., „HUMAN Fibroblast Interferon For Clinical Trials: Production, Partial Purification And Characterization”, *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, **16**, 49—55 (1979)). Ta linia komórkowa jest linią diploidalnych fibroblastów disomicznych w odniesieniu do chromosomu 21 i otrzymaną od 2-miesięcznego płodu ludzkiego. W porównaniu z linią T₂₁, linia E₁SM jest mniej wrażliwa na HuIFN- β (dziesięciokrotnie).

2. Badanie indukowania syntetazy 2,5-A. Inną metodą wykrywania obecności interferonu jest badanie indukowania syntetazy 2,5-A. Wykazano, że interferon indukuje ten enzym, który przeprowadza ATP w trimery (i mniejszym stopniu dimery, tetramery i multimery) 2,5-A (A. Kimchi i wsp., „Kinetics Of The Induction Of Three Translation-Regulatory Enzymes By Interferon”, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3208-3212 (1979)).

25 cm² butle z hodowlą komórek E₁SM (A. Billiau, supra) w stadium wzrostu odpowiadającym zlewaniu się komórek w jedną warstwę, traktuje się w ciągu 20 godzin bakteryjnymi ekstraktami rozcieńczonymi 1:6 lub kontrolnym interferonem w MEM zawierającym 10% płodowej

surowicy cielęcej. Hodowle rozprasza się za pomocą trypsyny (0,25%), EDTA (0,17%) i ekstensywnie przemywa 140 mM NaCl w 35 mM buforze Tris o pH 7,5. Wszystkie następne operacje prowadzi się w temperaturze 4°C. Komórki homogenizuje się w 1,5–2,0 objętościach 20 mM buforu HEPES o pH 7,4 zawierającego: 10 mM KCl, 1,5 mM octan magnezowy i 0,5 mM dwutiotreitol (bufor do lizy I) w szklanym homogenizatorze Dounce'a. Homogenat wiruje się w ciągu 20 minut przy $10\,000 \times g$ i supernatant (S10) przechowuje w płynnym azocie, jeżeli nie używa się go bezpośrednio.

Płytki do mikromiareczkowania z 96 dołkami z komórkami w stadium wzrostu odpowiadającym zlewaniu się komórek w jedną warstwę (10^5 komórek w 0,2 ml na 0,28 cm² dołek) traktuje się interferonem lub odpowiednimi ekstraktami bakteryjnymi, jak wyżej. Po 20 — godzinnym działaniu, płytki oziębia się na lodzie i przemywa 3 razy 140 mM NaCl w 35 mM buforze Tris o pH 7,5. Hodowle poddaje się potem lizie przez dodanie do każdego dołka 5 μ l roztworu zawierającego 0,5% Nonidet P 40 i 1 mM fluorek fenylometanosulfonylu (PMSF) w buforze do lizy I. Po energicznym mieszaniu w ciągu 20 minut na lodzie, lizaty komórek zbiera się i odwirowuje w ciągu 20 minut przy $10\,000 \times g$, jak opisano w powyższej części opisu.

3,5 μ l lizatu otrzymanego w sposób jak wyżej wskazano, (liza A lub liza B) inkubuje się w ciągu 2 godzin w temperaturze 31°C w 6 μ l mieszaniny do inkubacji zawierającej: 100 mM octan potasowy, 25 mM octan magnezowy, 10 mM HEPES/KOH o pH 7,4, 5 mM ATP, 4 mM fruktozo — 1,6 — dwufosforan, 1 mM dwutiotreitol i 20 μ l/ml poli(I).poli(C) oraz 2 μ Ci lizofilizowanego (α^{32} P)-ATP (400 Ci/milimol, z Radiochemical Centre, Amersham, Wielka Brytania). Po zatrzymaniu reakcji przez ogrzanie w ciągu 3 minut w temperaturze 95°C i sklarowanie przez wirowanie w ciągu 2 minut przy $9\,000 \times g$, próbki zadaje się alkaliczną fosfatazą z jelita cielęcia (Boehringer, Mannheim, nr kat. 405612) w stężeniu 150 jednostek/ml w ciągu 1 godziny w temperaturze 37°C, ponownie klaruje i nakrapla (1 μ l z próbki) na płytki do chromatografii cienkowarstwowej z polietylenoiminocelulozy (Polygram, cel 300 PEI 20 $\times$ 20 cm, produkcji Macherey-Nagel Co., Duren, RFN). Płytki przemywa się 2 razy po 2 litry wody destylowanej i suszy pod zmniejszonym ciśnieniem przed chromatografią w 1 M kwasie octowym w ciągu 2—3 godzin. Po wysuszeniu prowadzi się autoradiografię w ciągu 1—24 godzin.

C. Wykrywanie aktywności HuIFN- β w ekstraktach bakteryjnych.

1. Eksperymenty kontrolne. Przy przeprowadzaniu badań opisanych w powyższej części opisu natrafia się na dwa problemy zasadnicze. Obydwa są ważne przy interpretacji danych uzyskanych w wyniku tych badań. Ekstrakty bakteryjne (w tym ekstrakty kontrolne) otrzymane w rezultacie lizy wykonanej metodami opisanymi w powyższej części opisu, wydają się zawierać nieinterferonowy pokrewny czynnik, który w badaniach przejawia aktywność przeciwbakteryjną. Nie jest jasne, czy czynnik ten sam z siebie jest czynnikiem przeciwwirusowym, czy też jest on czynnikiem indukującym w warunkach badania przeciwwirusową substancję, np. interferon. Obecność tego czynnika stwierdza się w sposób powtarzalny w ekstraktach S100. Aktywność czynnika jest, prawdopodobnie z powodu zagęszczenia komórek, często wyższa w kontrolnych ekstraktach z *E. coli* HB101 niż w podobnych ekstraktach kontrolnych z bakterii — gospodarzy K12 Δ HI lub M5219, w których aktywność tego czynnika jest zawsze niższa od około 0,7 log₁₀/ml. Z pewnych przyczyn, przeciwwirusowa aktywność tego czynnika zmniejsza się, a czasem jest całkowicie wyeliminowana przez wysolenie (NH₄)₂SO₄ w warunkach, w których również interferon wytrąca się w eksperymentach kontrolnych.

Z powodu przeciwwirusowej aktywności przypisywanej temu zanieczyszczającemu czynnikowi trudno jest wyciągnąć wnioski o obecności śladowych ilości interferonu w ekstraktach bakteryjnych. Tym niemniej możliwe jest rozróżnienie przeciwwirusowej aktywności tego czynnika od aktywności naturalnego interferonu przez użycie diploidalnych fibroblastów E₁SM. Komórki te są mniej wrażliwe na HuIFN- β aniżeli zwyczajne komórki trisomiczne w odniesieniu do chromosomu 21. Natomiast, komórki te są znacznie bardziej wrażliwe na omawiany czynnik, aniżeli na interferon. Np. używając pMS2 — 7 (R. Devos i inni, „Construction And Characterization Of A Plasmid Containing A Nearly Full-size DNA Copy Of Bacteriophage MS2 RNA”, *J. Mol. Biol.*, 128, 595—619 (1979)) w *E. coli* HB101 (H. Boyer i D. Rouland-Dussoix, „A Complemen-

tation Analysis Of Restriction And Modification 0 DNA In Escherichia coli", J. Mol. Biol., 41, 459—472 (1969)) lub K12ΔHI — G — pPLa2311 jako lizatów kontrolnych, uzyskuje się wyniki wykazujące ten względny wpływ. Przedstawione są one w następującej tablicy, w której rezultaty pomiarów aktywności przeciwwirusowej podano jako log₁₀ jednostek/ml.

		T ₂₁	E ₁ SM
HB101-pMS2-7	(liza A)	0,7	
HB101-pMS2-7	(liza B, ale bez β-merkaptotetanolu i surowicy cielęcej)	<0,2	1,2
HB101-pMS2-7	(liza B)	nie oznaczano	0,7
HB101-pMS2-7	(liza B)	0,2	1,0
HB101-pMS2-7	(liza B)	0,7	2,5
K12ΔHI-G-pPLa2311	(liza B)	0,2	4,0
K12ΔHI-G-pPLa2311	(42°C, wstrząs osmotyczny)	0,5	>1,7

Poza tym, obecność naturalnego interferonu jest odbiciem różnego stosunku wielkości T₂₁:E₁SM i wysokiej wartości T₂₁ w porównaniu do powodowanej obecnością omawianego czynnika. Przedstawiają to następujące dane:

		T ₂₁	E ₁ SM
Supernatant po wstrząsie osmotycznym	K12-HI-G-pPLa2311 (42°C)	0,5	2,5
	K12ΔHI-G-pPLa2311 (42°C)		
	+ HuIFN-β (naturalny)	1,5	2,5
Liza B po wytrąceniu (NH ₄) ₂ SO ₄	HB101-pMS2-7	0,2	2,5
	HB101-pMS2-7 + HuIFN-β naturalny (dodany przed lizą)	2,7	2,5

Tak więc, porównanie aktywności T₂₁:E₁SM i pomiar absolutnej aktywności w komórkach T₂₁ pozwala na użycie badań aktywności przeciwwirusowej, opisanych w powyższej części opisu, do wykrycia w sposób niedwuznaczny aktywności HuIFN-β w ekstraktach bakteryjnych. Dalej, należy zauważyć, że w przypadku ekstraktów hodowli E. coli (zarówno K12ΔHI jak i M5219) transformowanych niektórymi plazmidami otrzymanymi sposobem według wynalazku, np. G-pPLa-HFIF-67-12, G-pPLa-HFIF-67-12Δ19, G-pPLc-HFIF-67-8, G-pPLa-HFIF-67-12Δ279T, G-pPLa-HFIF-67-12Δ218M1, G-pPLa-HFIF-67-12ΔM1 lub G-pPLa-HFIF-67-12Δ19 BX-2, ta interferencja nieznanego czynnika w badaniach aktywności przeciwwirusowej była mniejsza. W badaniach tych najbardziej zagęszczone ekstrakty (np. komórki z 150 ml hodowli o gęstości 6×10^8 komórek/ml poddano lizie i ekstrahowano w 4 ml) wykazują niską lub niewykrywalną aktywność przeciwwirusową, przypisywaną nieznanemu czynnikowi.

Wskazano również, że obecność tego zanieczyszczającego czynnika jest wykrywalna na podstawie badania indukowania aktywności syntetazy 2,5-A. Jednak w tym przypadku czynnik można wyeliminować całkowicie, przez wytrącanie (NH₄)₂SO₄. Tak więc, można w sposób niedwuznaczny wykryć tymi badaniami obecność HuIFN-β w ekstraktach bakteryjnych, odróżniając ją od obecności czynnika zanieczyszczającego.

Tym niemniej, ekstrakty E. coli HB101/G-pBR322, (Pst)/HFIF-6, w których sekwencja kodująca jest niecałkowicie kolinearna (nie zawiera tylko ostatnich kilku par zasad) i przez to niezdolna do ekspresji dojrzałego polipeptydu, indukują w sposób powtarzalny aktywność syntetazy 2,5-A, ale jak dotąd nie wykazują odróżnialnej aktywności przeciwwirusowej. Wykazuje to, że badanie 2,5-A nie może być uważane za jedyne kryterium obecności całkowitego wytworzonego przez bakterie interferonu. Wykazuje to również, że niecałkowity dojrzały interferon może wykazywać aktywność użyteczną.

Aktywność syntetazy 2,5-A mierzy się przez inkorporację ^{32}P do trimera 2,5-A, co wykazano przez autoradiografię.

Wyniki (powtarzane 3 razy) przedstawiono w tabeli, z wzrastającymi wartościami dodatnimi, będącymi odbiciem wzrastającej inkorporacji ^{32}P .

ekstrakt a/pHFIF-6 → +++	po wytrąceniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ → ++
ekstrakt b/pMS2-7 → +++	po wytrąceniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ → -
ekstrakt b/pMS2-7 → +++ + HuIFN- β	po wytrąceniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ → ++

Drugim ważnym problemem w tych badaniach jest niewielki odzysk HuIFN- β wydzielanego przez ludzkie fibroblasty w czasie i po upływie różnych stadiów eksperymentu. Porównanie odzysków interferonu z leukocytów i interferonu z fibroblastów dodanego do ekstraktu S-100 wykazuje, że HuIFN- β odzyskuje się tylko z 10% wydajnością, w przeciwieństwie do 100% odzysku HuIFN- α (właściwości przeciwwirusowe wyrażono w $\log_{10}$ jednostek/ml, badanie przy użyciu komórek T₂₁).

IFN- α	rozcieńczony w ekstrakcie S-100 HB101-pMS2-7 (liza A)	2,5
IFN- α	rozcieńczony w E-MEM + 3% surowicy cielęcej	2,7
IFN- β	rozcieńczony w ekstrakcie S-100 HB101-pMS2-7 (liza A)	0,7
IFN- β	rozcieńczony w E-MEM + 3% surowicy cielęcej	1,7

W innych eksperymentach, w których IFN- β dodaje się do osadzonych komórek przed lizą i ekstrakcją (dodaje się jedynie surowicę cielęcą do 3% jako stabilizator), wykazano, że odzyskuje się tylko 10—30% IFN- β .

		$\log_{10}$ jednostek/ml		
		HEPES	T ₂₁	E ₁ SM
HB101-pMS2-7 + IFN- β	(liza B, ale bez β -merkaptioetanolu lub surowicy cielęcej) (tak samo jak przy lizie B)	pH 8	0,7 (10%)	1,7
		pH 7	1,0 (20%)	1,7
		pH 6	0,7 (10%)	1,7
		pH 6	1,7 (50%)	1,5
IFN- β (bez bakterii)				

Dalsze eksperymenty prowadzi się w celu sprawdzenia stabilności i odzyskiwania aktywności IFN- β . Wytrącenie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jak opisano powyżej, zarówno w obecności jak i w nieobecności ekstraktów bakteryjnych powoduje często zmniejszenie miana w badaniu aktywności przeciwwirusowej:

		$\log_{10}$ jednostek/ml	
Wytrącanie $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$		przed	po
IFN- β		1,0	0,5
IFN- β		2,7	2,5
HB101-pMS2-7 + IFN- β (liza B)		1,5	1,2
K12 Δ HI-G-pPLa2311 (28°C) + IFN- β (liza B)		1,7	1,5
K12 Δ HI-G-pPLa2311 (28°C) + IFN- β (liza B)		2,2	3,0

Dializa IFN- β (całonocna, w temperaturze 4°C wobec PBS) zarówno w obecności, jak i w nieobecności ekstraktów bakteryjnych również daje zazwyczaj w rezultacie mniejszy odzysk aktywności HuIFN- β .

Dializa	log ₁₀ jednostek/ml	
	przed	po
IFN- β w PBS	1,0	0,5
IFN- β w PBS	2,7	2,5
K12 Δ HI-G-pPLa8 (28°C) + IFN- β (liza B)	1,2	<0,2
K12 Δ HI-G-pPLa8 + IFN- β (liza B)	3,0	1,7
K12 Δ HI-G-pPLa8 + IFN- β (liza B)	2,5	1,0
K12 Δ HI-G-pPLa8 + IFN- β (liza B)	1,5	0,5

Ponieważ IFN- β jest interferonem I typu, jego aktywność powinna być stabilna w środowisku kwaśnym. Badano to przez dializę próbek IFN- β w obecności lub nieobecności ekstraktów bakteryjnych, przez noc w: 5 mM glicyna — HCl (pH 2,2) w temperaturze 4°C. Tego rodzaju sposób postępowania powoduje tworzenie się osadu, który wydziela się wirując w wirówce Eppendorfa przy 12 000 $\times$ g w ciągu 2 minut. Następnie bada się aktywność przeciwwirusową supernatantu. Aczkolwiek część aktywności przeciwwirusowej pozostaje po tym badaniu, jest znaczna strata w ilości odzyskiwanego interferonu.

Dializa	log ₁₀ jednostek/ml	
	Przed	Po
HB101-pMS2-7 (liza A) + IFN- β	0,7	0,5
K12 Δ HI-G-pPLa2311 (28°C) po wstrząsie osmotycznym + IFN- β	1,2	1,2
M5219-G-pPLa8 (42°C) (liza B) + IFN- β	1,2	0,7
M5219-G-pPLa8 (28°C) (liza B) + IFN- β	3,0	2,0

Zmniejszenie aktywności HuIFN- β w stosunku do wyżej opisanych ekstraktów kontrolnych obserwowane po tych różnych rodzajach traktowania musi być interpretowane ostrożnie. Niższe miano aktywności przeciwwirusowej niekoniecznie oznacza, że interferon został zdegradowany. Niższe miano może być spowodowane niespecyficznym wiązaniem się HuIFN- β z błonami dializacyjnymi, albo z komponentami ekstraktów bakteryjnych, np. komponentami błon. Np. jest faktem ustalonym, że IFN- β jest hydrofobowym białkiem (o jego hydrofobowości decyduje również jego sekwencja aminokwasowa), które może ulegać niespecyficznemu przywieraniu do ścianek probówek lub innych powierzchni. Bakteryjny IFN- β , bez glikozylacji, może być nawet bardziej hydrofobowy. Tak więc, wnioski dotyczące odzyskiwania glikozylowanego IFN- β wydzielanego przez ludzkie komórki, niekoniecznie muszą być ekstrapolowane na IFN- β pochodzenia bakteryjnego.

2. Wykazanie aktywności IFN- β .

a. Aktywność przeciwwirusowa. Bada się aktywność przeciwwirusową IFN- β w ekstraktach bakteryjnych *E. coli* M5219 lub K12 Δ HI zawierających plazmidy: G-pPLa-HFIF-67-12, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19, G-pPLc-HFIF-67-8, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 279T, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 218M1, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 lub G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2. Sposoby indukowania i otrzymywania ekstraktów S-100 oraz supernatantów po wstrząsie osmotycznym są zasadniczo takie, jak wyżej opisany. Używa się 150 ml hodowli bakteryjnej ($3-6 \times 10^8$ komórek/ml) w 1 eksperymencie. Wszystkie miana biologiczne podaje się w log₁₀ jednostek/ml.

G-pPLa-HFIF-67-12. Plazmid G-pPLa-HFIF-67-12 stosuje się do transformowania *E. coli* M5219 i *E. coli* K12 Δ HI, a ekstrakty S100 otrzymuje się za pomocą lizy B. Wszystkie próbki wytrąca się (NH₄)₂SO₄ przed badaniem aktywności przeciwwirusowej.

	T ₂₁	E ₁ SM
K12 Δ HI-G-pPLa-HFIF-67-12 (28°C)	<0,2	<1,0
K12 Δ HI-G-pPLa-HFIF-67-12 (42°C, 90 minut)	0,2/0,5	<1,0/<1,0
M5219-G-pPLa-HFIF-67-12 (28°C)	<0,2	<1,0
M5219-G-pPLa-HFIF-67-12 (42°C, 90 minut)	0,7/0,7	<1,0/<1,2

Drugą wartością w powyższej tabelicy jest miano oznaczone po powtórnym badaniu tej samej próbki. W kontrolnych eksperymentach naturalny IFN- β dodaje się do *E. coli* HB101-pMS2-7 przed lizą komórek i wykazują one odzysk 30% IFN- β . Tak więc jest oczywiste, że po indukcji IFN- β w bakteryjnym lizacie wykrywa się aktywność przeciwwirusową. Miana, aczkolwiek niższe od poziomu wykrywanego za pomocą komórek E_1SM , wykazują jasno, że aktywność przeciwwirusowa IFN- β nie jest spowodowana aktywnością zanieczyszczeń bakteryjnych, które dawałyby wartość co najmniej 2,0 w odniesieniu do E_1SM , co odpowiada wartościom 0,5 lub 0,7 w odniesieniu do komórek T_{21} (patrz eksperymenty kontrolne w powyższej części opisu).

G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19. Plazmidu G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 używa się do transformowania *E. coli* M5219, a ekstrakty S-100 otrzymuje się za pomocą lizy B. Wszystkie próbki wytrąca się $(NH_4)_2SO_4$ jak opisano w powyższej części opisu, po czym bada ich aktywność przeciwwirusową. Obecność aktywności przeciwwirusowej HuIFN- β jest oczywista w ekstraktach. Wartości w nawiasach wskazują poziom wykrywalności zależny od toksyczności poszczególnych próbek dla komórek ludzkich w hodowli komórkowej I) M5219-G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 (28°C); II) M5219-G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 (42°C 90 minut, końcowa gęstość komórek = 3×10^8 /ml)

	T_{21}	E_1SM
I)	<0,5	2,2 (<2,0)
II)	2,2 (<0,5)	2,2 (<2,0)

Eksperymenty kontrolne, w których przed lizą komórek dodaje się naturalnego IFN- β , wykazuje 30% odzysku. Tutaj wysokie wartości w odniesieniu do komórek T_{21} i stosunek aktywności w odniesieniu do T_{21} do aktywności w odniesieniu do E_1SM wskazują, że nie ma znaczącego zanieczyszczenia bakteryjną aktywnością (co dyskutowano powyżej) w próbkach indukowanych temperaturą.

G-pPLc-HFIF-67-8. Plazmidu G-pPLc-HFIF-67-8 używa się do transformowania *E. coli* M5219, a ekstrakty S-100 otrzymuje się za pomocą lizy B. Wszystkie próbki wytrząsa się $(NH_4)_2SO_4$ i bada ich aktywność przeciwwirusową. I) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 (28°C); II) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 (42°C 180 minut, końcowa gęstość komórek = 6×10^8 /ml).

	T_{21}	E_1SM
I)	<0,5	2,2 (<2,0)
II)	2,2 (<0,5)	2,2 (<2,0)

Wartości podane w nawiasach wskazują poziom wykrywalności zależny od toksyczności. Kontrolne eksperymenty, w których przed lizą komórek dodaje się do HB101-pMS2-7 naturalny interferon, wykazują 30% odzysku. Jest więc oczywiste, że ekstrakty bakteryjne wykazują przeciwwirusową aktywność HuIFN- β .

W innym eksperymencie bada się aktywność przeciwwirusową IFN- β supernatantu tych komórek po wstrząsie osmotycznym: I) kontrola: M5219-G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 (28°C), II) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 (28°C); III) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 (42°C, 180 minut, gęstość komórek = 6×10^8 /ml).

Badania przeprowadza się w odniesieniu do komórek T_{21} , zarówno przed, jak i po wytrąceniu siarczanem amonu. Wartości w nawiasach wskazują granicę wykrywalności.

	Przed wytrąceniem	Po wytrąceniu
I)	<0,2	<0,2
II)	<0,2	<0,2
III)	1,5 (<0,2)	0,7 (<0,2)

Odzyk IFN- β wynosi w eksperymentach kontrolnych około 10%. Kontrolne lizaty nie wykazują wykrywalnej aktywności w odniesieniu do E₁SM. Wartości otrzymane dla supernatantów po wstrząsie osmotycznym wskazują jasno, że ekstrakty indukowanego temperaturą M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 wykazują aktywność przeciwwirusową nie występującą w próbkach nie indukowanych. Próbkę (III) po wytrąceniu (NH₄)₂SO₄ wykazującą miano 0,7 log₁₀ jednostek/ml dializuje się do pH 2,2 w sposób jak opisano w powyższej części opisu. Nie wykazuje ona większego obniżenia aktywności. Ta stabilność w odczynie kwaśnym jest szczególną właściwością interferonów I typu, np. IFN- β .

G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 279T. Plazmidu G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 279T używa się do transformowania E. coli M5219, a ekstrakty S-100 otrzymuje się za pomocą lizy B. Próbkę wytrąca się (NH₄)₂SO₄ przed badaniem CPE w komórkach T₂₁. Ekstrakty komórek indukowanych w temperaturze 42°C wykazują miano przeciwwirusowe 1,5—1,7 log₁₀ jednostek/ml ekstraktu.

G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 218M1. Plazmidu G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 218M1 używa się do transformowania E. coli M5219, a ekstrakty S-100 otrzymuje się za pomocą lizy B. Próbkę wytrąca się (NH₄)₂SO₄ przed badaniem CPE w komórkach T₂₁. Ekstrakty komórek indukowanych w temperaturze 42°C wykazują miano przeciwwirusowe 1,5 log₁₀ jednostek/ml ekstraktu.

G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1. Plazmidu G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 używa się do transformowania E. coli M5219, a ekstrakty S-100 otrzymuje się za pomocą lizy B. Próbkę wytrąca się (NH₄)₂SO₄ przed badaniem CPE w komórkach T₂₁. Ekstrakty komórek indukowanych w temperaturze 42°C wykazują miano przeciwwirusowe 2,0 log₁₀ jednostek/ml ekstraktu.

G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2. Plazmidu G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2 używa się do transformowania E. coli K12 Δ HI, a ekstrakty S-100 otrzymuje się za pomocą lizy B. Próbkę wytrąca się za pomocą (NH₄)₂SO₄ przed badaniem CPE w komórkach T₂₁ i FS-4. Ekstrakty komórek indukowanych w temperaturze 42°C wykazują miano przeciwwirusowe 1,7—2,0 log₁₀ jednostek/ml ekstraktu.

b. Neutralizacja przeciwwirusowej aktywności HuIFN- β za pomocą przeciwciał.

Dalszych danych potwierdzających bakteryjną ekspresję IFN- β dostarczają eksperymenty dotyczące neutralizacji za pomocą przeciwciał. Przeciwciało przeciw interferonowi tworzone jest przez kozy uodpornione 10⁷ jednostkami naturalnego IFN- β (wydzielonego przez ludzkie fibroblasty) oczyszczonego za pomocą kulek szklanych o kontrolowanej wielkości porów (A. Billiau i wsp., supra). Po zbadaniu aktywności przeciwwirusowej ekstraktów bakteryjnych, jak wyżej opisano, seryjne rozcieńczenia przeciwciała dodaje się do podobnych próbek, mieszaninę inkubuje się w ciągu 1 godziny, w temperaturze 37°C, stosuje w odniesieniu do ludzkich diploidalnych fibroblastów T₂₁ i bada aktywność przeciwwirusową jak wyżej opisano. Stopień neutralizacji przez przeciwciało przeciw IFN- β znajduje się w zakresie od +++ (całkowita neutralizacja) do — (brak neutralizacji). Wartości podane w nawiasach wskazują przybliżone rozcieńczenia przeciwciała, w którym zachodzi 50% neutralizacja.

1) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 (42°C, 180 minut, co daje 2,2 log₁₀ jednostek przeciwwirusowych/ml w odniesieniu do komórek T₂₁).

2) M5219-G-pPLa-8 (42°C, 180 minut, do których dodano przed lizą IFN- β (z ludzkich fibroblastów), co daje 1,7 log₁₀ jednostek przeciwwirusowych/ml w odniesieniu do komórek T₂₁).

Rozcieńczenie przeciwciała	(1)	(2)
10 ⁻³	+++	+++
10 ⁻⁴	+	+++
10 ⁻⁵	±(10 ^{-4,5})	+++
10 ⁻⁶	—	±(10 ⁻⁶)
10 ⁻⁷	—	—

Podobne wyniki otrzymuje się w przypadku ekstraktów M5219-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 (42°C). Różnice w mianie neutralizacyjnym między bakteryjnym IFN- β otrzymanym sposobem według wynalazku a naturalnym IFN- β mogą być wynikiem różnic antygenowości lub specyficznej

aktywności IFN tych białek bakteryjnych w stosunku do naturalnego IFN- β , spowodowanych brakiem glikozylacji białek bakteryjnych.

c. Stabilność przeciwwirusowej aktywności HuIFN- β .

1) Działanie ciepłem. W przeciwieństwie do IFN- α , IFN- β odznacza się tą bardzo niezwykłą właściwością, że jego przeciwwirusową aktywność odzyskuje się po lizie we wrzącym 1% SDS, 1% β -merkaptotanolu, 5 M moczniku (W.E. Stewart II i wsp., „Distinct Molecular Species of Human Interferon, Requirements For Stabilization And Reactivation Of Human Leucocyte And Fibroblast Interferon”, J. Gen. Virol. 26, 327—331 (1975)), aczkolwiek zazwyczaj nie uzyskuje się 100% odzysku. W przypadku tego rodzaju badania komórki bakteryjne ze 150 ml hodowli zawieszają się w buforze do lizy B, dodaje równą objętość 2% SDS, 2% β -merkaptotanolu i 10 M mocznika, po czym otrzymaną mieszaninę gotuje się w ciągu 2 minut, w wyniku czego otrzymuje się frakcję S-100. I) kontrola: M5219-G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 (28°C); II) kontrola: 3 log₁₀ jednostek HuIFN- β rozcieńczonych buforem do lizy B; III) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 (42°C, 180 minut, gęstość komórek = 6×10^8 /ml).

Badania przeprowadza się w odniesieniu do komórek T₂₁. Wartości w nawiasach wskazują granicę wykrywalności, zależną od toksyczności wewnętrznej.

	Przed gotowaniem	Po gotowaniu
I)	<1,5	<1,5
II)	2,2 (<1,5)	2,0 (<0,5)
III)	3,0 (<2,0)	2,2 (<1,5)

Eksperymenty kontrolne wykazują odzysk wynoszący około 10% aktywności IFN- β . W równoległych kontrolnych lizatach przy użyciu E₁SM nie stwierdza się wykrywalnej wartości IFN- β . Dane te wykazują w sposób oczywisty, że aczkolwiek tylko około 10% dodanego IFN- β odzyskuje się w eksperymentach kontrolnych, aktywność przeciwwirusowa IFN- β obecna jest w ekstraktach z indukowanych temperaturą hodowli M5219-G-pPLc-HFIF-67-8, nawet po tak ostrym potraktowaniu. Rzeczywiście, po tego rodzaju potraktowaniu stwierdzono wyższą aktywność przeciwwirusową w porównaniu z lizą B, co wskazuje na możliwość przywierania IFN- β do komponentów komórkowych w tej ostatniej metodzie.

2) Dializa. Przeciwwirusowa aktywność HuIFN- β nie dializuje. Np. po dializie wobec PBS w ciągu 16 godzin w warunkach obojętnego pH i temperatury 4°C, przeciwwirusowa aktywność (log₁₀ j/ml) ekstraktów bakteryjnych zostaje utrzymana, aczkolwiek w zmniejszonym mianie. I) M5219-pPLc-HFIF-67-8 (42°C); II) M5219-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 (42°C); III) IFN- β w M5219-pPLa-8 (42°C).

	Przed dializą	Po dializie
I)	2,3	2,3
I)	3	2,3
I)	1,5	1,3
II)	2,3	1,3
II)	2,3	2
II)	2,3	1

Obserwowane zmniejszenie się aktywności po dializie może wynikać z niespecyficznego wiązania się IFN- β z błonami dializacyjnymi itd.

3) Wytrącanie (NH₄)₂SO₄. Przeciwwirusowa aktywność (log₁₀ jednostek/ml) ekstraktów bakteryjnych utrzymuje się po wytrąceniu siarczanem amonowym przy 67% nasycenia (2 objętości (NH₄)₂SO₄ na 1 objętość ekstraktu). Wiadomo, że przy tym stężeniu HuIFN- β wytrąca się. Po upływie 30 minut przetrzymywania na lodzie, osad odwirowuje się przy 12 000 $\times$ g w ciągu 10 minut i ponownie rozpuszcza w PBS w celu przeprowadzenia badań. I) M5219-pPLc-HFIF-67-8 (42°C); II) M5219-pPLa-HFIF-12 Δ 19 (42°C); III) IFN- β w M5219-pPLa-8 (42°C).

	Przed wytrąceniem	Po wytrąceniu
I)	2	2
I)	2	2,3
II)	2	2
III)	1,3	1,3
III)	1,5	1,3

4) Działanie pH 2. Przeciwwirusowa aktywność ekstraktów bakteryjnych według wynalazku jest również stabilna w odczynie kwaśnym. Ekstrakty dializuje się w ciągu 15 godzin wobec 50 ml glicyny — HCl o pH 2,2, a następnie wobec PBS w ciągu 3 godzin, albo zakwasza się HCl, po czym zobojętnia NaOH. Po usunięciu prowadzi się badania. I) M5219-pPLc-HFIF-67-8 (42°C); II) M5219-pPLa-HFIF-67-12Δ19 (42°C); III) IFN-β w M5219-pPLa-8 (42°C).

	Przed działaniem kwasu	Po działaniu kwasu
I)	2	1,3
I)	0,7	0,7
II)	2	1
III)	3	2

d) Aktywność syntetazy 2,5-A. W M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 po wstrząsie osmotycznym (jak wyżej opisano) bada się aktywność syntetazy 2,5-A, jak wyżej opisano, z użyciem płytek do mikromiareczkowania, z tą różnicą, że zamiast komórek E₁SM używa się komórek HeLa. Użytkuje się następujące wyniki: I) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 (28°C) (patrz wyżej); II) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 (42°C) (patrz wyżej).

Wartości te, będące odbiciem aktywności syntetazy 2,5-A wskazują na to, że promienio-twórczy ³²P wbudowuje się do trimerowej postaci 2,5-A.

	Ilość zliczeń (zliczenia/min)	Po odjęciu tła (zliczenia/min)
1) komórki nie poddane działaniu	3342	0
2) ekstrakt bakteryjny(I): rozcieńczenie 1/6	1972	-1370
3) ekstrakt bakteryjny (II): rozcieńczenie 1/6	6960	3618
4) ekstrakt bakteryjny (I) + IFN-β do 1,5 log ₁₀ jednostek/ml	7037	3695
5) patrz p. 3, ale po inkubacji z przeciwciałem przeciw IFN-β	3950	608
6) patrz p. 4, ale po inkubacji z przeciwciałem przeciw IFN-β	2960	-382
7) kontrola IFN-β 0,5 log ₁₀ jednostek/ml	4463	1120
8) kontrola IFN-β 1 log ₁₀ jednostek/ml	7680	4338
9) kontrola IFN-β 1,5 log ₁₀ jednostek/ml	13615	10273
10) kontrola IFN-β 2 log ₁₀ jednostek/ml	25040	21698

Wyniki badań aktywności syntetazy 2,5-A wykazują, że supernatant po wstrząsie osmotycznym indukowanego temperaturą M5219-G-pPLc-HFIF-67-8, który wykazywał przeciwwirusową aktywność (patrz wyżej), indukuje również aktywność syntetazy 2,5-A, podczas gdy w szczepach nie indukowanych bakterii nie występuje to zjawisko. Koresponduje to z wynikami badań aktywności przeciwwirusowej.

Stopień stymulacji syntetazy 2,5-A jest równy aktywności IFN-β dodanego do kontrolnego lizatu (porównaj próbki (3) i (4)). Użycie krzywej stężeń wykreślonej na podstawie próbek 7—10 wskazuje na to, że biorąc pod uwagę rozcieńczenie, aktywność odpowiadającą 1,7 log₁₀ jedno-

stek/ml można oznaczyć w obydwu próbkach (3) i (4) i jest ona porównywalna z wartościami uzyskanymi w bezpośrednim badaniu przeciwwirusowym, to jest $1,5 \log_{10}$ jednostek w obydwu próbkach. Wyniki tej grupy eksperymentów wykazują, że także indukcja syntetazy 2,5-A może być neutralizowana przez przeciwciała przeciw IFN- β , jak w przypadku badań aktywności przeciwwirusowej.

e. Aktywność przeciwwirusowa w innych liniach komórkowych.

Ekstrakty (I) i (II) (M5219-G-pPLC-HFIF-67-8, jak wyżej) bada się również pod względem aktywności przeciwwirusowej w różnych liniach komórkowych pochodzenia kociego, mysiego, małpiego lub króliczego. Nie wykazują one wykrywalnej aktywności przeciwwirusowej w komórkach tego rodzaju. Nie wykazuje jej również naturalny IFN- β wytwarzany w komórkach ludzkich. Nie stwierdza się także aktywności w kociej linii komórek płucnych, wrażliwych na ludzki interferon z leukocytów. Te wyniki dostarczają dalszego dowodu na to, że IFN- β tworzony przez bakterie wykazuje właściwości zasadniczo identyczne z właściwościami IFN- β wydzielonego przez fibroblasty ludzkie.

7. Wrażliwość na proteazę. Wrażliwość otrzymanego sposobem według wynalazku IFN- β z bakterii bada się za pomocą działania na rozcieńczone ekstrakty bakteryjne wzrastającymi ilościami trypsyny w ciągu 1 godziny, w temperaturze 37°C. Przeciwwirusowa aktywność IFN- β jest uszkodzana przez trypsynę w stężeniu podobnym do tego, które uszkadza aktywność naturalnego IFN- β dodanego do nieaktywnego lizatu kontrolnego.

	Trypsynowy punkt końcowy (ms/ml)
M5219-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 (42°C) (1000 j/ml)	0,03
M5219-pPLC-HFIF-67-8 (42°C) (1000 j/ml)	0,03
IFN- β w 5219-pPLa-8 (42°C) (1000 j/ml)	0,03
M5219-pPLC-HFIF-67-8 (42°C) (30 j/ml)	0,03
IFN- β w M5219-pPLa-8 (42°C) (30 j/ml)	0,03

3. Identyfikacja czynnego produktu IFN- β .

Różne eksperymenty wykazują, że pre-HuIFN- β jest nieaktywny i nie ulega przekształceniu przez komórki, lub w warunkach badań, do produktu czynnego. Tym niemniej, aktywność IFN- β wykrywana w różnych ekstraktach bakteryjnych, opisanych w powyższej części opisu, prawdopodobnie zależy od przekształceń przewidywanych połączonych białek (np. HuIFN-połączonego z β -laktamazą, MS2 lub bakteryjnymi sekwencjami sygnałowymi) przez bakterie, lub w warunkach badań, do czynnego produktu.

Nie jest pewne, czy produkt czynny obecny w tych ekstraktach jest dojrzałym HuIFN- β (dojrzały HuIFN- β jest, oczywiście, produktem G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 i G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2). Tym niemniej, frakcjonowanie ekstraktów bakteryjnych w elektroforezie w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących ujawnia obecność dwóch produktów aktywnych. Pierwszy z tych produktów ma przybliżoną masę cząsteczkową 15 000—18 000 daltonów i mógłby odpowiadać dojrzałemu IFN- β . Drugi produkt o wyższej masie cząsteczkowej może być połączonym produktem lub produktem niecałkowicie przekształconym wykazującym aktywność HuIFN- β , względnie produktem przekształconym do dojrzałego IFN- β w warunkach badań. Oznaczanie sekwencji aminokwasowej różnych produktów ekspresji, przy użyciu znanych metod, pozwoli na określenie jaki produkt białkowy, jeżeli w ogóle występuje, wykazuje łącznie z dojrzałym HuIFN- β aktywność HuIFN- β .

Podwyższenie wydajności i aktywności polipeptydów wykazujących aktywność HuIFN- β otrzymanych sposobem według wynalazku.

Poziom produkcji białka jest determinowany przez 3 główne czynniki: ilość kopii genu tego białka w komórce, wydajność transkrypcji tych kopii genu i wydajność translacji. Wydajność transkrypcji i translacji, które składają się na ekspresję, jest z kolei zależna od sekwencji nukleotydowych normalnie usytuowanych przed pożądaną sekwencją kodującą. Te sekwencje nukleo-

tydowe czyli sekwencje kodujące ekspresję określają, między innymi, miejsce z którym oddziałuje polimeraza RNA przy inicjacji transkrypcji (sekwencja promotorowa) i w którym rybosomy łączą się i oddziałują z mRNA (produktem transkrypcji) w celu inicjacji translacji. Nie wszystkie sekwencje kontrolujące ekspresję działają z taką samą wydajnością. Jest więc korzystne oddzielenie specyficznej sekwencji kodującej żądane białko od sąsiadujących sekwencji nukleotydowych i, w miejsce tego, połączenie jej z innymi znanymi sekwencjami kontrolującymi ekspresję, a przez to danie pierwszeństwa wyższemu poziomowi ekspresji. Aby uzyskać to, można nowo wytworzony fragment DNA włączyć do plazmidu dającego dużą ilość kopii, lub do pochodnej bakteriofaga, w celu zwiększenia ilości kopii genu w komórce i przez to polepszenia wydajności ekspresji białka.

Można zastosować kilka sekwencji kontrolujących ekspresję, jak opisano w powyższej części opisu. Należy do nich operator, promotor i sekwencje wiązania i oddziaływania z rybosomami (w tym sekwencje takie jak sekwencje Shine — Dalgarno) operonu laktozowego *E. coli* (układ *lac*), odpowiadające sekwencje układu syntetazy tryptofanu *E. coli* (układ *trp*), większe regiony operatora i promotora faga λ ($O_L P_L$ jak wyżej opisano i $O_R P_R$), region kontrolny jednoniciowego faga DNA Filamentous, lub inne sekwencje, które kontrolują ekspresję genów prokariotycznych lub eukariotycznych komórek i ich wirusów. To też, w celu polepszenia wytwarzania określonego polipeptydu w odpowiednim organizmie gospodarza, gen kodujący ten polipeptyd można otrzymać jak poprzednio, usunąć z rekombinantowej cząsteczki DNA i umieścić bliżej poprzedniej sekwencji kontrolującej ekspresję lub pod kontrolę jednej z powyższych sekwencji kontrolujących ekspresję. Metody takie są znane.

Inne metody polepszania wydajności translacji obejmują insercję oligonukleotydów otrzymanych na drodze chemicznej lub enzymatycznej przed kodonem inicjującym. Sposobem tym można uzyskać lepszą strukturę mRNA, tak pierwszorzędową jak i drugorzędową. Bardziej szczegółowo, sekwencję można tak określić, że inicjujący kodon AUG znajduje się w łatwo dostępnej pozycji (to jest pozycji nie maskowanej przez strukturę drugorzędową), zarówno na szczycie „szpili do włosów” jak i w innych jednoniciowych regionach. Można także podobnie optymalizować pozycję i sekwencję wyżej wspomnianego odcinka Shine — Dalgarno. Ważność ogólnej struktury (sfaldowanie) mRNA została udokumentowana (D. Iserentant i W. Fiers, „Secondary Structure Of mRNA Efficiency Of Translation Initiation”, *Gene*, 9, 1—12 (1980)):

Dalszy wzrost wydajności w komórce pożądanego produktu zależy od wzrostu ilości genów, które mogą być użytkowane przez komórkę. Można to osiągnąć przez insercję genu HuIFN- β (tak wraz z jego elementami kontrolującymi transkrypcję i translację, jak i bez nich) zarówno do plazmidu dającego dużą ilość kopii, jak i do plazmidu, w którym ilość kopii kontrolowana jest przez temperaturę (jest to plazmid będący nosicielem mutacji takiej, że ilość kopii plazmidu wzrasta pod wpływem wzrostu temperatury, B. Uhlin i wsp., „Plasmids With Temperature-dependent Copy Number For Amplification Of Cloned Genes And Their Products”, *Gene*, 6, 91—106 (1979)). Alternatywnie, wzrost ilości kopii genu można osiągnąć np. przez insercję rekombinantowych cząsteczek DNA wytworzonych w sposób uprzednio opisany do umiarkowanego bakteriofaga λ , najprościej przez trawienie plazmidu enzymem restrykcyjnym z otrzymaniem linearnej cząsteczki, którą miesza się następnie z poddanym działaniu enzymu restrykcyjnego nośnikiem klonującym (faga λ) (np. typu opisanego przez N.E. Murraya i wsp., „Lambdoid Phages That Simplify The Recovery Of In Vitro Recombinants”, *Mol. Gen. Genet.*, 150, 53—61 (1977)) oraz „Molecular Cloning Of The DNA Ligase Gene From Bacteriophage T 4”, *J. Mol. Biol.*, 132, 493—505 (1979)), a następnie tworzy się rekombinantową cząsteczkę DNA przez inkubację z ligazą DNA. Wyselekcjonowuje się żądany rekombinantowy fag, jak poprzednio, i używa do lizogenizacji gospodarza, szczepu *E. coli*.

Szczególnie użyteczne wektory klonujące λ wykazują mutację wrażliwości na temperaturę genu represyjnego *cl* i mutacje podatne na supresję mutacji w genie *S*, którego produkt jest niezbędny w lizie komórki gospodarza i genie *E*, którego produkt jest głównym białkiem kapsydu wirusa. W tym układzie komórki lizogenne hoduje się we względnie niskiej temperaturze (np. 28°—32°C), a następnie ogrzewa do temperatury wyższej (np. 40—45°C) w celu indukowania

wycięcia profaga. Przedłużony wzrost w wyższej temperaturze prowadzi do wyższego poziomu tworzenia białka, które zostaje zatrzymane w komórce, ponieważ nie ulegają one lizie przez produkty genu faga w normalny sposób i ponieważ wprowadzony fragment genu faga nie jest osłonięty, pozostaje dostępny dla dalszej transkrypcji. Sztuczna liza komórek pozwala następnie na wydzielenie żadanego produktu z dużą wydajnością. Ponieważ w niniejszym zgłoszeniu używa się również układu represorowego λ w celu kontroli ekspresji, może być niezbędne kontrolowanie wycięcia profaga i przez to ilości kopii genów za pomocą heteroodpornego regionu kontrolnego np. otrzymanego z lambdoidalnego faga 21.

Należy rozumieć, że polipeptydy wykazujące aktywność IFN- β (otrzymane sposobem według wynalazku) można otrzymywać w postaci połączonego białka (np. połączonego z prokariotycznym N-końcowym odcinkiem kierującym wydzielaniem) lub w postaci prointerferonu (np. zaczynającego się interferonową sekwencją sygnałową, który może być odszczepiona przy wydzielaniu) lub jako dojrzały interferon. Ta ostatnia sytuacja jest korzystna, gdyż dojrzały interferon z fibroblastów zaczyna się metioniną, aminokwasem wykorzystywanym do inicjacji translacji. Uzysk polipeptydów w różnych postaciach może podwyższyć się przez jakąkolwiek kombinację metod diskutowanych w powyższej części opisu. Także, można podstawić różne kodony w miejsce niektórych lub wszystkich kodonów użytych w obecnych sekwencjach DNA. Te podstawione kodony mogą kodować aminokwasy identyczne z tymi, które są kodowane przez kodony zastąpione lecz z wyższą wydajnością polipeptydu. Alternatywnie, zastąpienie jednego lub kombinacji kodonów prowadzi do zastąpienia aminokwasów lub do dłuższego, względnie krótszego polipeptydu pokrewnego HuIFN- β , co może zmienić jego właściwości w użyteczny sposób (np. wzrost stabilności, wzrost rozpuszczalności, wzrost aktywności przeciwwirusowej, wzrost aktywności syntetazy 2,5-A lub wzrost zakresu specyficznych gospodarzy).

W końcu, aktywność polipeptydów tworzonych przez rekombinantowe cząsteczki DNA, otrzymane sposobem według wynalazku, może być wzmożona przez fragmentację, modyfikację lub otrzymywanie pochodnych sekwencji DNA lub polipeptydów otrzymywanych sposobem według wynalazku, znanymi środkami, bez odejścia od istoty wynalazku.

Identyfikacja chromosomalnego genu kodującego HuIFN- β .

Zbiór hybrydowych fagów otrzymanych z fragmentów płodowego ludzkiego chromosomalnego DNA, utworzonego przez częściowe rozszczepienie HaeIII i AluI i połączenie łącznikami EcoRI z odgałęzieniami Charon 4 A λ został otrzymany przez R.M. Lawn'a i wsp., („Cell”, 15, 1157—1174 (1978)). Ten bank genowy poddaje się screeningowi metodą in situ (W.D. Benton i R.W. Davis, Science, 196, 180—182 (1977), T. Maniatis i wsp., Cell, 15, 687—701 (1978)), z użyciem jako próbki fragmentu do wprowadzania cDNA IFN- β znakowanego ^{32}P , wyciętego przez enzymy restrykcyjne TagI-BgIII z pHFIF-21*. Jeden dodatni pod względem hybrydyzacji klon faga izoluje się z 600 000 łysinek przez powtarzane oczyszczanie łysinek (T. Maniatis i wsp., supra). Materiał z tej łysinki oznaczono λ CH4A-gHFIF-1. Analiza restrykcyjna materiału z tej łysinki wykazuje, że zawiera on około 16,3 kilobaz (Kb) ludzkiego DNA.

Przez trawienie EcoRI λ CH4A-gHFIF-1 tworzy się, oprócz dwóch odgałęzień Charon 4 A faga, osiem fragmentów do wprowadzania o długości 4,6, 3,5, 2,4, 1,9, 1,3, 1,2, 0,8 i 0,6 Kb. Po przeprowadzeniu hybrydyzacji metodą Southerna okazuje się, że tylko fragment o 1,9 Kb hybrydyzuje z fragmentem TagI-BgIII pHFIF-21.

* Plazmid pHFIF-21 identyfikuje się za pomocą screeningu sposobem według wynalazku. Fragment TagI-BgIII tego plazmidu zawiera prawie cały nie ulegający translacji region 5' i cały region kodujący IFN- β .

Fragment o 1,9 Kb reklonuje się bezpośrednio do miejsca EcoRI pBR325 (pochodna pBR322, która również zawiera marker oporności na chloramfenikol z pojedynczym miejscem EcoRI). Po połączeniu 0,6 μg DNA λ CH4A-gHFIF-1 trawionego EcoRI ze 100 ng pBR325 i transformowaniu E. coli HB101 wyselekcjonowuje się kilka klonów. Tylko klony zawierające fragment o 1,9 Kb hybrydyzują z próbką cDNA IFN- β . Klon ten oznaczono p(325)-gHFIF-4.

Porównanie fragmentów restrykcyjnych z pHFIF-21 oraz p(325)-gHFIF-4 unaocznia, że nie ma sekwencji wtrąconych w chromosomalnym klonie i że informacja w DNA tego klonu jest identyczna z informacją pHFIF-21.

Identyfikacja i izolowanie chromosomalnego DNA kodującego HuIFN- β umożliwia transformowanie tym DNA odpowiednich gospodarzy z ekspresją HuIFN- β . Ekspresja ta jest korzystna, ponieważ różne sygnały związane z sekwencją chromosomalnego DNA będą w tych klonach obecne. Te sygnały będą dostępne przy wyzwalaniu wyższej wydajności ekspresji i, być może, przy poekspresyjnym przetwarzaniu polipeptydu kodowanego przez region kodujący chromosomalnego DNA.

Przykładami drobnoustrojów i rekombinantowych cząsteczek DNA otrzymanych sposobem według wynalazku są hodowle zdeponowane w kolekcji szczepów Deutsche Sammlung von Mikroorganismen in Gottingen, RFN, w dniu 2 kwietnia 1980 i identyfikowane jako HFIF-A do C:

A: *E. coli* Hb101 (G-pBR322(Pst)/HFIF3); B: *E. coli* Hb101 (G-pBR322(Pst)/HFIF6); C: *E. coli* HB101 (G-pBR322(Pst)/HFIF7);.

Hodowle te oznaczono numerami rejestracyjnymi, odpowiednio, DSM 1791—1793.

Przykładami są również hodowle zdeponowane w kolekcji szczepów Deutsche Sammlung von Mikroorganismen in Gottingen, RFN, w dniu 5 czerwca 1980 i identyfikowano jako HFIF-D do G:

D: *E. coli* M5219 (G-pPLa-HFIF-67-12); E: *E. coli* K12 Δ HI (G-pPLa-HFIF-67-12); F: *E. coli* M5219 (G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19); G: *E. coli* M5219 (G-pPLc-HFIF-67-8).

Hodowle te oznaczono numerami rejestracyjnymi, odpowiednio, DSM 1851—1854.

Przykładami są także hodowle zdeponowane w America Type Culture Collection, Rockville, Maryland, w dniu 26 lutego 1981 i identyfikowano jako HFIF H i I:

H: *E. coli* M5219 (pPLa-HFIF-67-12 Δ M1); I: *E. coli* HB101 (p/325/-gHFIF-4).

Hodowle te oznaczono numerami rejestracyjnymi, odpowiednio, ATCC 31824 i 31825.

Podczas gdy w powyższej części niniejszego opisu przedstawiono szereg zastosowań sposobu według wynalazku, jest oczywiste, że podstawowa konstrukcja może być zmieniana z zapewnieniem innych zastosowań z użyciem sposobów i kompozycji według wynalazku. Tak więc, należy wnioskować, że istota wynalazku jest zdefiniowana przez załączone zastrzeżenia, a nie przez specyficzne zastosowania przedstawione w powyższej części opisu jedynie jako przykłady.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób wytwarzania polipeptydu typu IFN- β , znamienny tym, że prowadzi się hodowlę organizmu gospodarza stransformowanego zrekombinowaną cząsteczką DNA zawierającą sekwencję DNA wybraną z następującej grupy:

a) inserty DNA w zrekombinowanych cząsteczkach G-pPLa-HFIF-67-12, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 i G-pPLc-HFIF-67-8, zawartych w mikroorganizmach, które zdeponowano pod numerami odpowiednio DSM 1851—1854,

b) inserty DNA w zrekombinowanych cząsteczkach G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 279T, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 218M1, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 i G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2, przy czym insert DNA G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 jest insertem zrekombinowanej cząsteczki zawartej w mikroorganizmie zdeponowanym pod numerem ATCC 31824,

c) insert DNA w zrekombinowanej cząsteczce p [325]-gHFIF-4, która zawarta jest w mikroorganizmie zdeponowanym pod numerem ATCC 31825,

d) sekwencje DNA, które hybrydują w 68°C i przy 0,3 M NaCl z insertami i sekwencjami określonymi w a), b) i c) i które kodują polipeptyd typu IFN- β i

e) sekwencje DNA, które są zdegenerowane w wyniku degeneracji kodu genetycznego i odpowiadają sekwencjom DNA i insertom określonym w a), b), c) i d) i które kodują polipeptyd typu IFN- β , przy czym wybrana sekwencja DNA jest związana z sekwencją kontrolującą ekspresję.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny** tym, że sekwencja DNA wchodząca w skład zrekombinowanej cząsteczki DNA wybrana jest z grupy obejmującej sekwencje o wzorach:

ATGACCAAVAAGTGTCTCCTCCAAATTGCTCTCCTGTTGTGCTTCTCCACTACAGCTC
TTTCCATGAGCTACAACCTTGCTTGGATTCTACAAAGAAGCGCCAATTTTCAGTGTC
AGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATG
AACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGGAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGC
CGCATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTC
ATCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCTATCA
TCAGATAAACCATCTGAAGACAGTCTGGAAGAAAACTGGAGAAAGAAGATTTC
CCAGGGGAAAACTCATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTG
CATTACCTGAAGGCCAAGGAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCATAGTCAG
AGATCCTAAGGAACTTTTACTTCATTAACAGACTTACAGGTTACCTCCGAAAC i ATG
AGCTACAACCTTGCTTGGATTCTACAAAGAAGCAGCAATTTTCAGTGTGAGAAGCTC
CTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGGACAGGATGAACCTTTGA
CATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGACGCCGCATTGA
CCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGATTCATCTAGCAC
TGGCTGGAATGAGACTATTGTTGACAACCTCCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAA
CCATCTGAAGACAGTCTGGAAGAAAACTGGAGAAAGAAGATTAGGGAAAACTC
ATGAGCAGTCTGCTGTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTG
AAGGCCAAGGAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCAATAGTCAGAGTGGAATCCTAA
GGAACCTTACTTCATTAACAGACTTACAGGTTACCTCCGAAAC.

3. Sposób według zastrz. 1 albo 2, **znamienny** tym, że sekwencja kontrolująca ekspresję wybrana jest z grupy obejmującej system lac, system β -lac, system trp, regiony głównego operatora i promotora faga λ , region kontrolny fd otoczki białkowej i inne sekwencje, które kontrolują ekspresję genów w komórkach prokariotycznych i eukariotycznych i ich wirusach.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny** tym, że gospodarzem jest mikroorganizm wybrany z grupy składającej się ze szczepów *E. coli*, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, innych *Bacilli*, innych gospodarzy bakteryjnych, drożdży i grzybów oraz komórek zwierzęcych i roślinnych.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny** tym, że w przypadku wytwarzania polipeptydu o wzorze: Met-Thr-Asn-Lys-Cys-Leu-Leu-Gln-Ile-Ala-Leu-Leu-Leu-Cys-Phe-Ser-Thr-Thr-Ala-Leu-Ser-Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn prowadzi się hodowlę organizmu gospodarza stransformowanego zrekombinowaną cząsteczką DNA, która zawiera sekwencję DNA wybraną z:

a) insertów DNA zrekombinowanych cząsteczek G-pPLa-HFIF-67-12, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 i G-pPLc-HFIF-67-8, które to zrekombinowane cząsteczki zawarte są w mikroorganizmach zdeponowanych pod numerami DSM 1851—1854 odpowiednio,

b) insertów DNA zrekombinowanych cząsteczek G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 279T, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 218M1, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 i G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2, przy czym insert DNA G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 jest insertem zrekombinowanej cząsteczki zawartej w mikroorganizmie zdeponowanym pod numerem ATCC 31824,

c) insertu DNA w zrekombinowanej cząsteczce p[325]-gHFIF-4, która zawarta jest w mikroorganizmie zdeponowanym pod numerem ATCC 31825,

d) sekwencji DNA, które hybrydyzują w 68°C i przy 0,3 M NaCl z insertami i sekwencjami DNA określonymi w a), b) i c) i które kodują polipeptyd typu IFN- β i

e) sekwencji DNA, które są zdegenerowane w wyniku degeneracji kodu genetycznego i odpowiadają sekwencjom DNA i insertom określonym w a), b), c) i d) i które kodują polipeptyd typu IFN- β .

6. Sposób według zastrz. 1, znamienny tym, że w przypadku wytwarzania polipeptydu o wzorze: Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn prowadzi się hodowlę organizmu gospodarza stransformowanego zrekombinowaną cząsteczką DNA, która zawiera sekwencję DNA wybraną z:

a) insertów DNA zrekombinowanych cząsteczek G-pPLa-HFIF-67-12, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 i G-pPLc-HFIF-67-8, które to zrekombinowane cząsteczki zawarte są w mikroorganizmach zdeponowanych pod numerami DSM 1851—1854 odpowiednio,

b) insertów DNA zrekombinowanych cząsteczek G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 279T, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 218M1, G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 i G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2, przy czym insert DNA G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 jest insertem zrekombinowanej cząsteczki zawartej w mikroorganizmie zdeponowanym pod numerem ATCC 31824,

c) insertu DNA w zrekombinowanej cząsteczce p[325]-gHFIF-4, która zawarta jest w mikroorganizmie zdeponowanym pod numerem ATCC 31825,

d) sekwencji DNA, które hybrydyzują w 68°C i przy 0,3 M NaCl z insertami i sekwencjami DNA określonymi w a), b) i c) i które kodują polipeptyd typu IFN- β i

e) sekwencji DNA, które są zdegenerowane w wyniku degeneracji kodu genetycznego i odpowiadają sekwencjom DNA i insertom określonym w a), b), c) i d) i które kodują polipeptyd typu IFN- β .

7. Sposób według zastrz. 2, znamienny tym, że w przypadku wytwarzania polipeptydu o wzorze: Met-Thr-Asn-Lys-Cys-Leu-Leu-Gln-Ile-Ala-Leu-Leu-Leu-Cys-Phe-Ser-Thr-Thr-Ala-Leu-Ser-Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn prowadzi się hodowlę organizmu gospodarza stransformowanego zrekombinowaną cząsteczką DNA zawierającą następującą sekwencję DNA:

ATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAATTGCTCTCCTGTTGTGCTTCTCCACTACAGCTC
TTTCCATGAGCTACAACCTTGCTTGGATTCTACAAAGAAGCAGCAATTTTCAGTGT
CAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGCACAGGAT
GAACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGGAGGAC
GCCGCATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAGACAAGA
TTCATCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCTAATGTCTA
TCATCAGATAAACCATCTGAAGACAGTCCTGGAAGAAAACTGGAGAAAGAAGAT
TTCACCAGGGGAAAACTCATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTATGGGAGGA
TTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGAGTACAGTCACTGTGCCTGGACCATAGTCAG
AGTGGAATCCTAAGGAACCTTTTACTTCATTAACAGACTTACAGGTTACCTCCGAAAC.

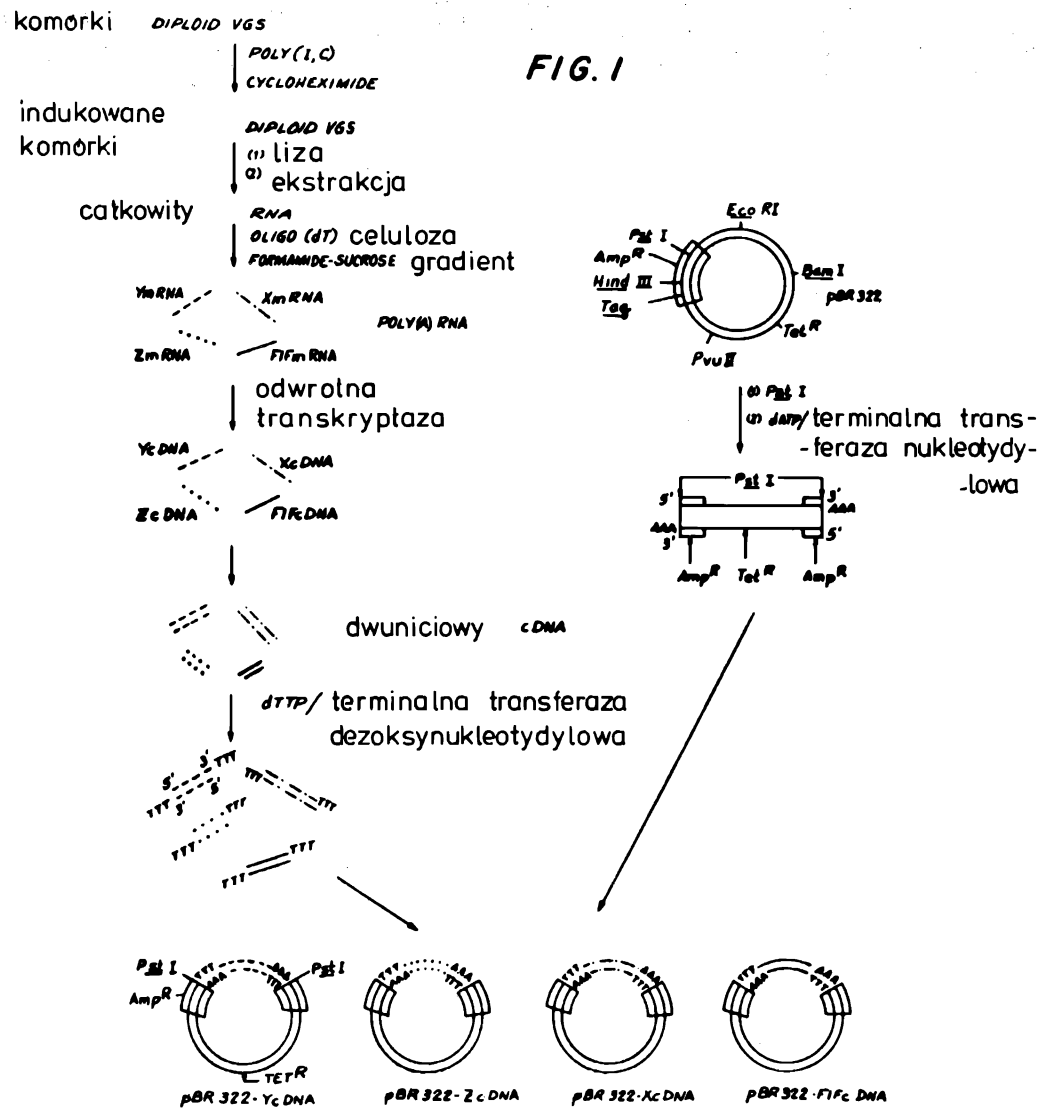


FIG. 2

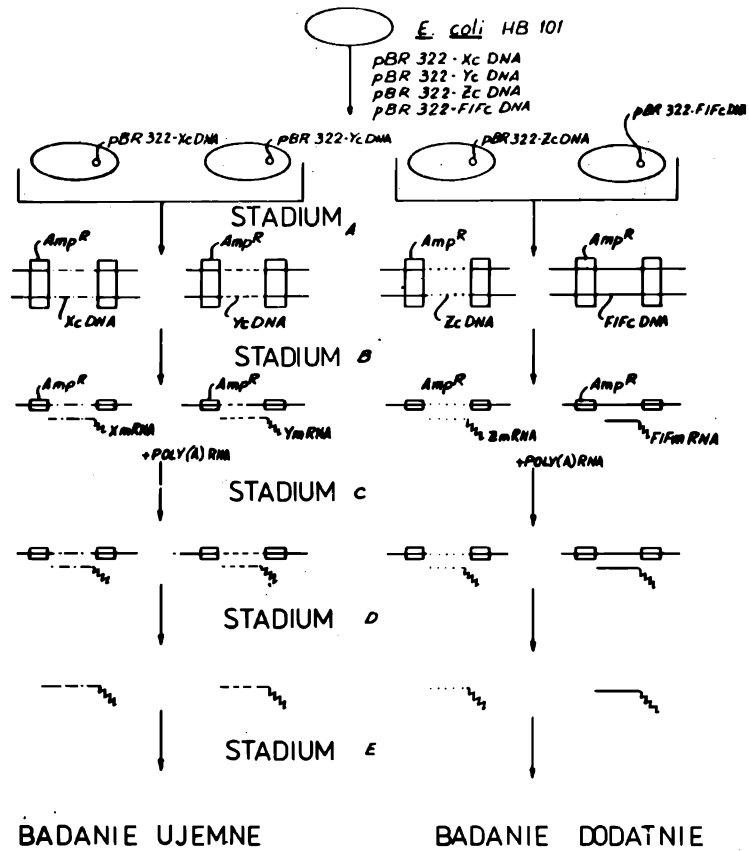
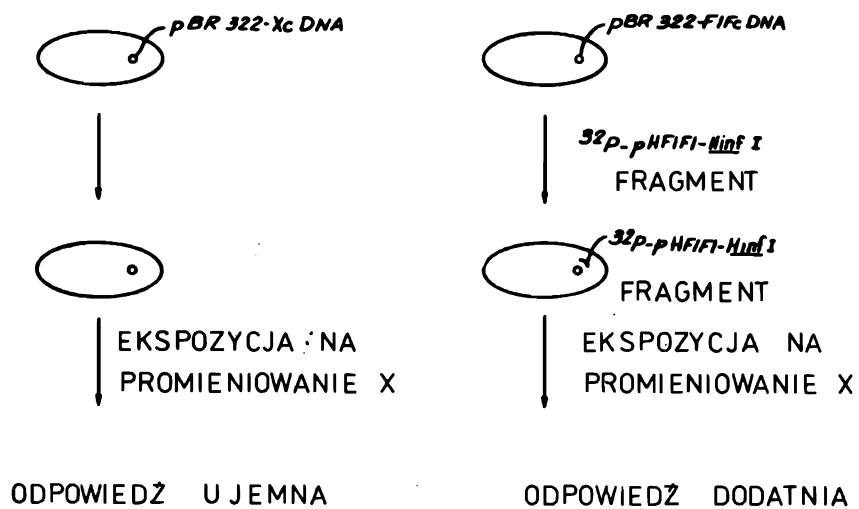


FIG. 3



⁻¹⁰
 MET-THR-ASN-LYS-CYS-LEU-LEU-GLN-ILE-ALA-LEU-LEU-
 GCAA CCTTTCGAAG CCTTGTCTC GGCACAACAG GTAGTAGGCG AACTGTTCG TGTGTTGAC ATG,ACC,AAC,AAG,TGT,CTC,CTC,CAA,ATT,GCT,CTC,CTG,₁₀₀
⁻¹ ⁺¹ ¹⁰ ²⁰
 LEU-CYS-PHE-SER-THR-THR-ALA-LEU-SER-MET-SER-TYR-ASN-LEU-LEU-GLY-PHE-LEU-GLN-ARG-SER-SER-ASN-PHE-GLN-CYS-GLN-LYS-LEU-LEU-
 TTG,TGC,TTT,CTC,ACT,ACA,GCT,CTT,TCC,ATG,AGC,TAC,AAC,TTG,CTT,GGG,TTT,CTA,CAA,AGA,AGC,AGC,AAT,TTT,CAG,TGT,CAG,AAG,CTC,CTG,₁₉₀
³⁰ ⁴⁰ ⁵⁰
 TRP-GLN-LEU-ASN-GLY-ARG-LEU-GLU-TYR-CYS-LEU-LYS-ASP-ARG-MET-ASN-PHE-ASP-ILE-PRO-GLU-GLU-ILE-LYS-GLN-LEU-GLN-GLN-PHE-GLN-
 TGG,CAA,TTG,AAT,GGG,AGG,CTT,GAA,TAC,TGC,CTC,AAG,GAC,AGG,ATG,AAC,TTT,GAC,ATC,CCT,GAG,GAG,ATT,AAG,CAG,CTG,CAG,CAG,TTT,CAG,₂₈₀
⁶⁰ ⁷⁰ ⁸⁰
 LYS-GLU-ASP-ALA-ALA-LEU-THR-ILE-TYR-GLU-MET-LEU-GLN-ASN-ILE-PHE-ALA-ILE-PHE-ARG-GLN-ASP-SER-SER-SER-THR-GLY-TRP-ASN-GLU-
 AAG,GAG,GAC,GCC,GCA,TTG,ACC,ATC,TAT,GAG,ATG,CTC,CAG,AAC,ATC,TTT,GCT,ATT,TTT,AGA,CAA,GAT,TCA,TCT,AGC,ACT,GGC,TGG,AAT,GAG,₃₇₀
⁹⁰ ¹⁰⁰ ¹¹⁰
 THR-ILE-VAL-GLU-ASN-LEU-LEU-ALA-ASN-VAL-TYR-HIS-GLN-ILE-ASN-HIS-LEU-LYS-THR-VAL-LEU-GLU-GLU-LYS-LEU-GLU-LYS-GLU-ASP-PHE-
 ACT,ATT,GTG,GAG,AAC,CTC,CTG,GCT,AAT,GTG,TAT,CAT,CAG,ATA,AAC,CAT,CTG,AAG,ACA,GTG,CTG,GAA,GAA,AAA,CTG,GAG,AAA,GAA,GAT,TTT,₄₆₀
¹²⁰ ¹³⁰ ¹⁴⁰
 THR-ARG-GLY-LYS-LEU-MET-SER-SER-LEU-HIS-LEU-LYS-ARG-TYR-TYR-GLY-ARG-ILE-LEU-HIS-TYR-LEU-LYS-ALA-LYS-GLU-TYR-SER-HIS-CYS-
 ACC,AGG,GGA,AAA,CTC,ATG,AGC,AGT,CTG,CAC,CTG,AAA,AGA,TAT,TAT,GGG,AGG,ATT,CTG,CAT,TAC,CTG,AAG,GCC,AAG,GAG,TAC,AGT,CAC,TGT,₅₅₀
¹⁵⁰ ¹⁶⁰
 ALA-TRP-THR-ILE-VAL-ARG-VAL-GLU-ILE-LEU-ARG-ASN-PHE-TYR-PHE-ILE-ASN-ARG-LEU-THR-GLY-TYR-LEU-ARG-ASN
 GCC,TGG,ACC,ATA,GTG,AGA,GTG,GAA,ATC,CTA,AGG,AAC,TTT,TAC,TTT,ATT,AAC,AGA,CTT,ACA,GGT,TAC,CTC,CGA,AAC,TGA AGATCTCCTA GCCTG₆₄₃
 TGCCT CTGGGACTGG ACAATTGCTT CAAGCATTCT TCAACCAGCA GATGCTGTTT AAGTGACTGA TGGCTAATGT ACTGCATATG AAAGBACACT AGAAGATTTT GAAAT,₇₅₃
 TTTTA ITAAATTATG AGTTATTTTT ATTTATTTAA ATTTTATTTT GGAATAAATTATTTTTGG TGCAAAAGTC AAAAAAAA, ...

FIG. 4

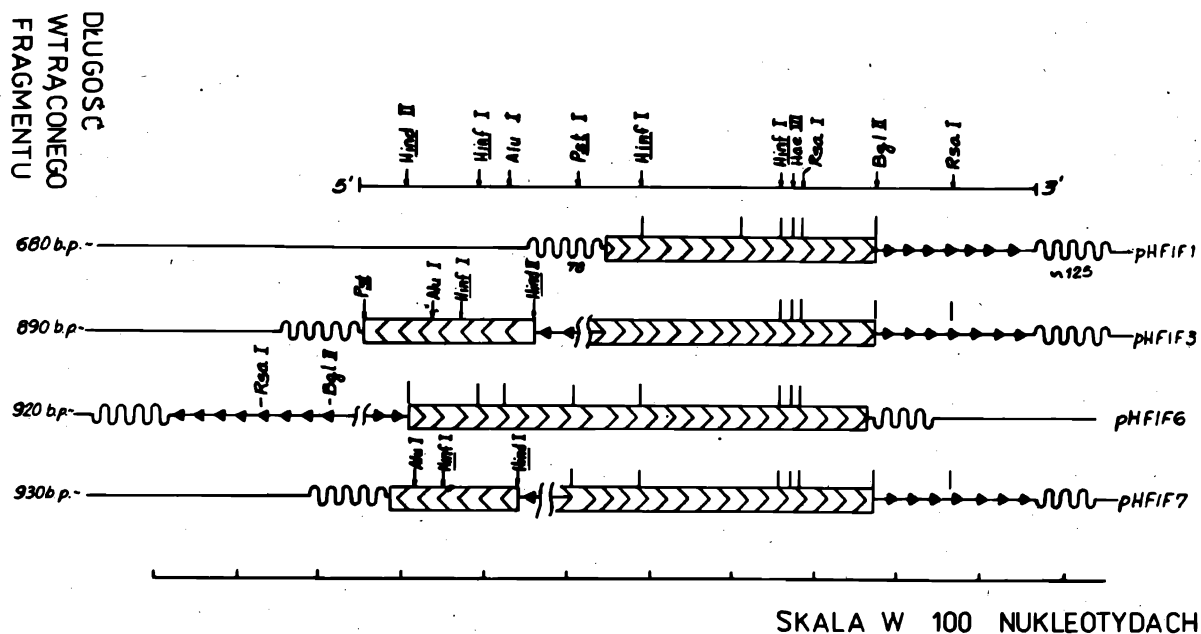


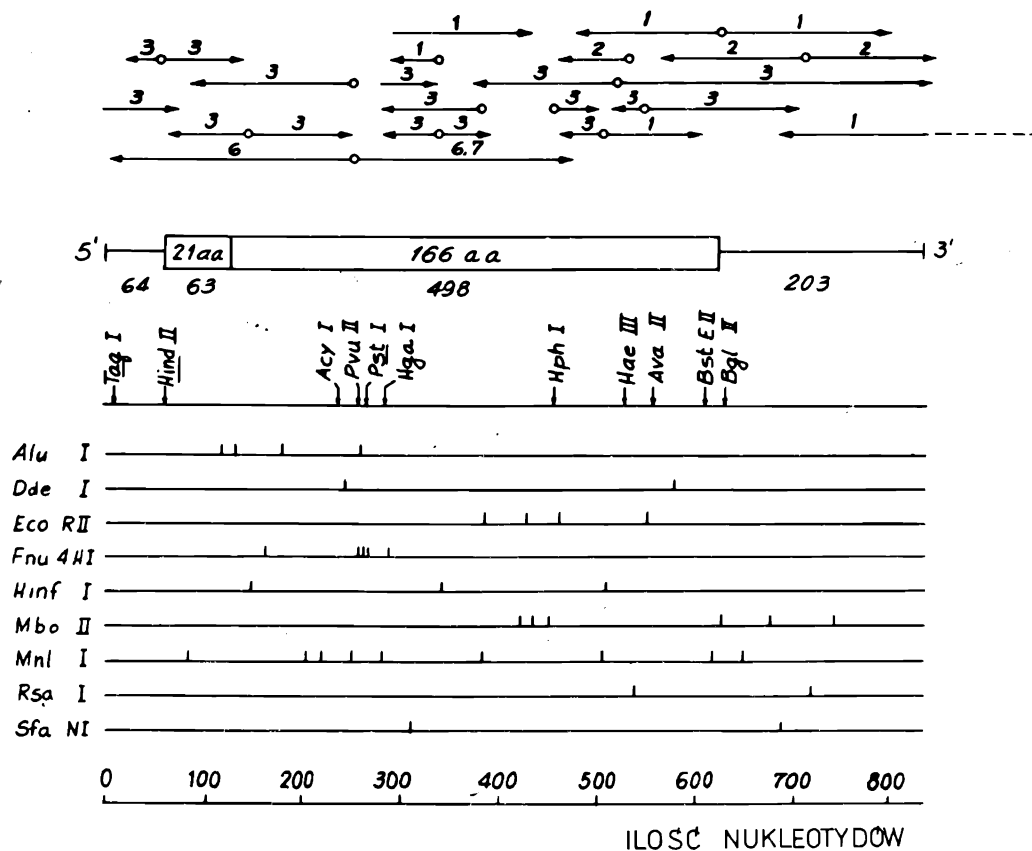
FIG. 5

SKŁAD AMINOKWASOWY LUDZKIEGO INTERFERONU
Z FIBROBLASTÓW

FIG. 6

AMINOKWAS	SKŁAD		
	Z BEŚPOŚR. BADANIA TAN ET AL.	Z BEŚPOŚR. BADANIA KNIGHT ET AL.	WYDEDUKOWANY Z SEKWENCJI NUKLEOTYDOWEJ
ASP	20.6	18.9	5 17
ASN			12
THR	8.0	6.8	7
SER	11.7	10.5	9
GLU	27.5	27.0	13
GLN			11 24
PRO	4.4	2.7	1
GLY	5.4	7.8	6
ALA	9.3	10.0	6
CYS	N.D.	1.7	3
VAL	7.9	6.0	5
MET		2.9	4
ILE	10.0	9.0	11
LEU	26.9	20.4	24
TYR	3.2	7.5	10
PHE	7.7	9.4	9
HIS	4.6	4.9	5
LYS	12.3	11.6	11
ARG	8.6	10.9	11
TRP	0.0	1.0	3
OGÓŁEM	168	169	166

FIG. 7



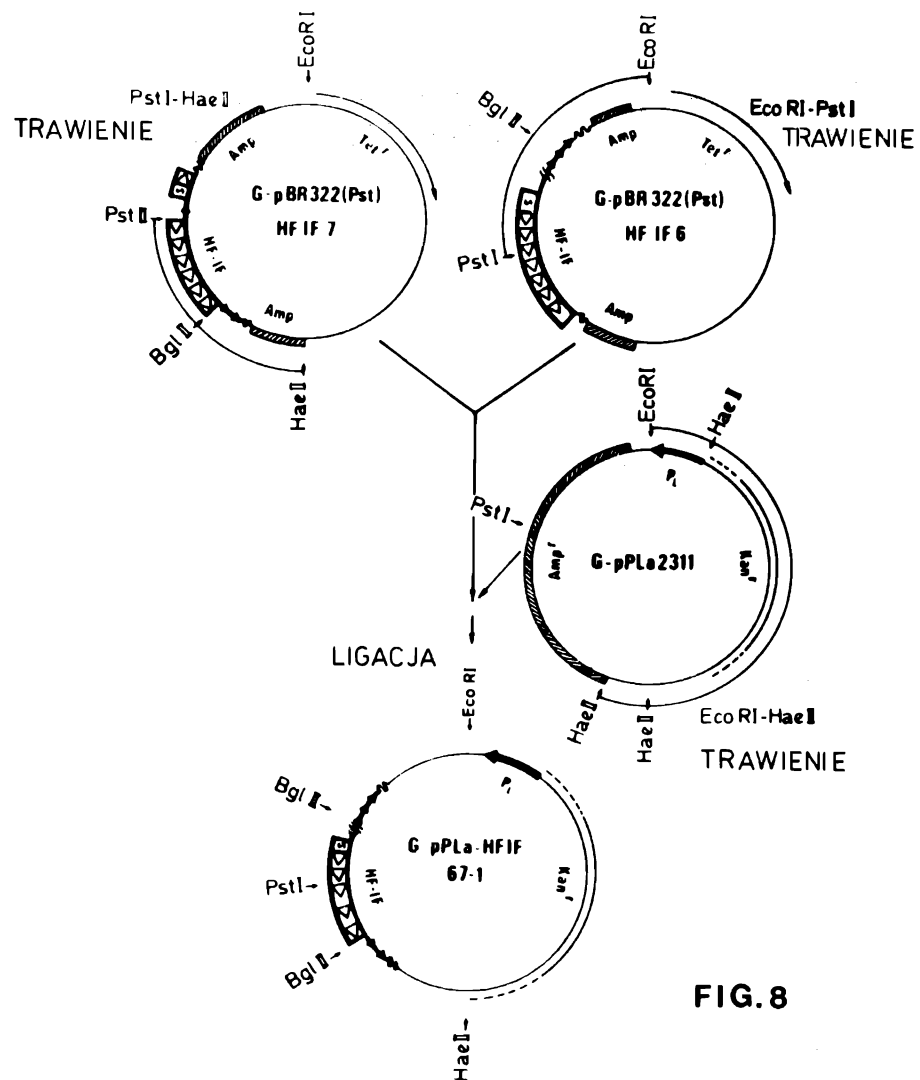


FIG. 8

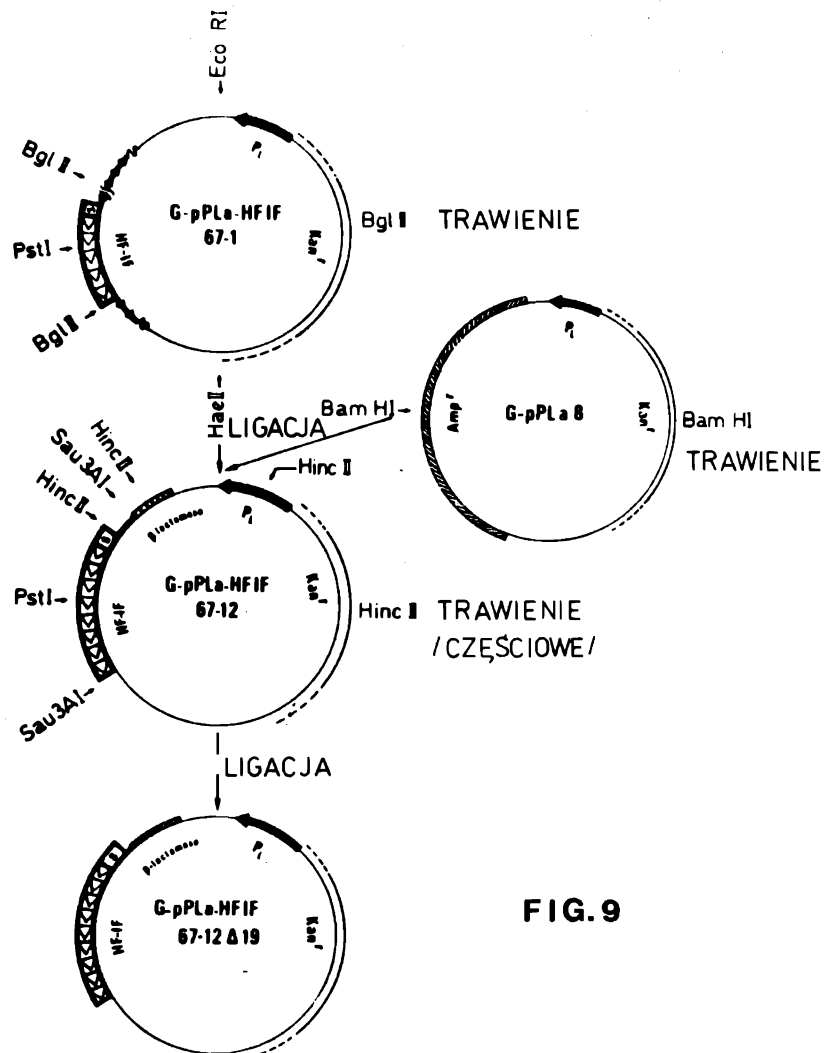


FIG. 9

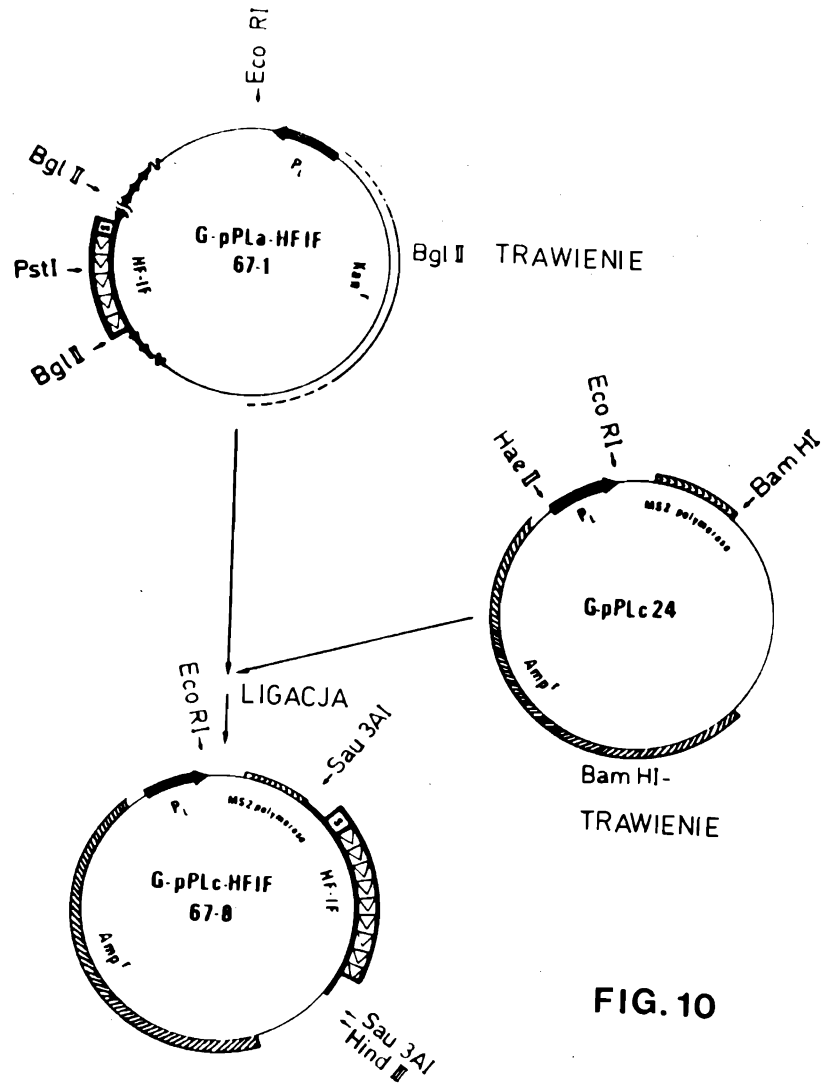


FIG. 10

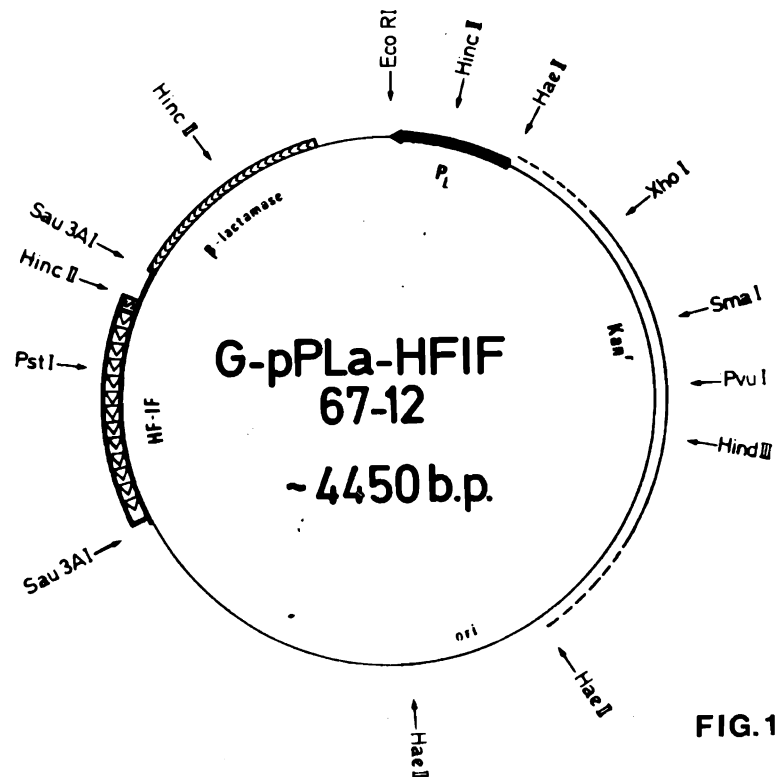


FIG. 11

FIG.12

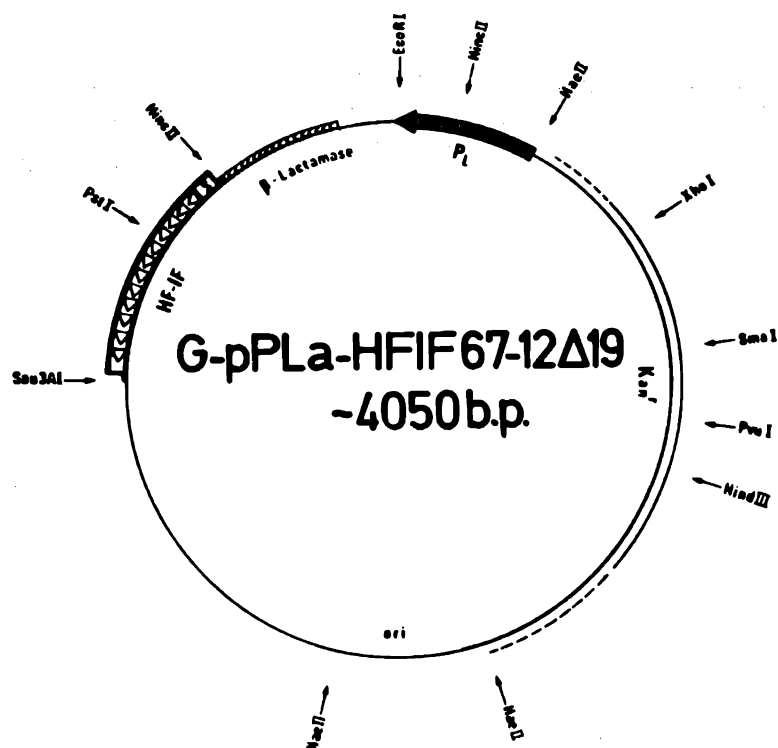


FIG.13

