



(19) **Republik
Österreich
Patentamt**

(11) Nummer: **AT 394 209 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 3708/85

(51) Int.Cl.⁵ : **C12N 15/21**

(22) Anmelddetag: 9.11.1981

C12N 1/21, C12P 21/02, // (C12N 1/21
C12R 1:19)

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 8.1991

(62) Ausscheidung aus Anmeldung Nr.: 4807/81

(30) Priorität:

10.11.1980 US 205579 beansprucht.
23. 2.1981 US 237388 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

GENENTECH, INC.
SOUTH SAN FRANCISCO (US).

(56) Entgegenhaltungen:

NATURE, VOL. 287, 1980; S. 411-416
NATURE, VOL. 284, 1980; S. 316-320

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG NEUER MIKROORGANISMEN ZUR PRODUKTION VON HYBRIDEN
HUMAN-LEUKOZYTEN-INTERFERONEN

(57) Verfahren zur Herstellung neuer Mikroorganismen, die zur Produktion von Polypeptiden mit der Aminosäuresequenz von hybriden Human-Leukozyten-Interferonen fähig sind, dadurch gekennzeichnet, daß man einen Mikroorganismus mit einem replikablen Expressionsvektor, der eine für hybrides Human-Leukozyten-Interferon kodierende DNA-Sequenz enthält, in an sich bekannter Weise transformiert und kultiviert.

AT 394 209 . B

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung neuer Mikroorganismen, die zur Produktion von Polypeptiden mit der Aminosäuresequenz von hybriden Human-Leukozyten-Interferonen fähig sind. Das erfindungsgemäße Verfahren ist dadurch gekennzeichnet, daß man einen Mikroorganismus mit einem replikablen Expressionsvektor, der eine für hybrides Human-Leukozyten-Interferon kodierende DNA-Sequenz enthält, in an sich bekannter Weise transformiert und kultiviert.

5 Verhältnismäßig homogene Leukozyten-Interferone sind aus Leukozyten normaler oder leukämischer Spender gewonnen worden. Diese Interferone sind eine Familie von Proteinen, die sich durch ein starkes Vermögen, in ihren Target-Zellen einen Virus-resistenten Zustand herzustellen, auszeichnen. Außerdem vermag Interferon auf die Zellvermehrung hemmend und die Immunreaktion modulierend zu wirken. Diese Eigenschaften haben die 10 klinische Verwendung von Interferon als therapeutisches Mittel zur Behandlung viraler Infektionen und bösartiger Erkrankungen veranlaßt.

15 In jüngerer Zeit ist die rekombinante DNA-Technologie dazu herangezogen worden, verschiedene Human-Leukozyten-Interferone, deren Aminosäure-Sequenzen größtenteils ähnlich 70 % Homologie untereinander zeigen, mikrobiell herzustellen (Nature 290, 20-26 (1981)). Gene, die verschiedene Leukozyten-Interferone, z. B. LeIF A, B, C, D, F, G und H, kodieren, können aus der von H. P. Koeffler und D. W. Golde (Science 200, 1153-1154 (1978)) beschriebenen Zelllinie KG-1, die bei der American Type Culture Collection unter der ATCC-Nr. CRL 8031 hinterlegt wurde, erhalten werden, und via Expressionsplasmide in Wirtsbakterien, vorzugsweise E. coli K-12 Stamm 294 (ATCC-Nr. 31445, hinterlegt am 28. Oktober 1978), eingeführt und dort zur Expression gebracht werden. Durch die Kombination von DNA-Sequenzen, die Teile natürlich vorkommender 20 Interferone kodieren, und deren Expression in Mikroorganismen, beispielsweise in E. coli K-12, erhält man neue, antivirale Polypeptide, sog. Hybrid-Leukozyten-Interferon, die sich in ihrer Wirkung sowohl qualitativ wie quantitativ von den bekannten Leukozyten-Interferonen unterscheiden. In der Literatur ist die Herstellung hybrider Leukozyten-Interferone bisher nicht beschrieben worden.

25 Das Zugpferd der rekombinanten DNA-Technologie ist das Plasmid, eine nicht-chromosomal Schleife doppelsträngiger DNA in Bakterien und anderen Mikroben, häufig in Vielfach-Kopien pro Zelle. In der in der Plasmid-DNA verschlüsselten Information ist die enthalten, die zum Reproduzieren des Plasmids in Tochterzellen erforderlich ist (d. h. ein "Replicon") und gewöhnlich ein oder mehrere Auswahlcharakteristika, wie im Falle von Bakterien, die Resistenz gegenüber Antibiotikis, die Klone der das Plasmid von Interesse enthaltenden Wirtszelle zu erkennen und bevorzugt in selektiven Medien zu züchten erlauben. Die Brauchbarkeit von Plasmiden liegt in 30 der Tatsache, daß sie durch die eine oder die andere Restriktions-Endonuklease oder "Restriktions-Enzym" spezifisch gespalten werden können, die jeweils eine andere Stelle an der Plasmid-DNA erkennen. Danach können heterologe Gene oder Genfragmente in das Plasmid durch das Verbinden der Enden an der Spaltstelle oder an rekonstruierten Enden nahe der Spaltstelle eingebaut werden. Die DNA-Rekombination erfolgt außerhalb der Zelle, aber das anfallende "rekombinante" Plasmid kann nach einem als Transformation bekannten Verfahren in 35 sie eingeführt werden und große Mengen des heterologen Gen enthaltenden rekombinanten Plasmids können durch Kultivierung der transformierten Zellen erhalten werden. Ferner kann, wenn das Gen bezüglich Teilen des Plasmids, die die Transkription und Translation der verschlüsselten DNA-Botschaft steuern, geeignet eingesetzt ist, der sich ergebende Expressionsträger tatsächlich dazu verwendet werden, die Polypeptidsequenz zu produzieren, für die das eingesetzte Gen codiert, ein Verfahren, das als Expression bezeichnet wird.

40 Expression beginnt in einem Bereich, der als Promoter bekannt ist, der von RNA-Polymerase erkannt und gebunden wird. In manchen Fällen, wie beim Tryptophan- oder "trp"-Promoter, der bei der praktischen Durchführung der Erfindung bevorzugt ist, überlappen sich Promoter-Bereiche mit "Operator"-Bereichen unter Bildung eines kombinierten Promoter-Operators. Operatoren sind DNA-Sequenzen, die von sogenannten Repressorproteinen erkannt werden, die dazu dienen, die Frequenz des Beginns einer Transkription an einem besonderen Promoter zu regeln. Die Polymerase geht an der DNA entlang und überträgt die im Codierstrang 45 enthaltene Information vom 5'- zum 3'-Ende auf Messenger-RNA, die wiederum in ein Polypeptid übertragen wird, das die Aminosäuresequenz besitzt, die die DNA codiert. Jede Aminosäure wird durch ein Nucleotid-Triplett oder "Codon" in etwas verschlüsselt, was für die vorliegenden Zwecke als "Strukturgen" bezeichnet werden kann, d. h. dem Teil, der die Aminosäuresequenz des exprimierten Produkts verschlüsselt. Nach der Bindung an den 50 Promoter transkribiert die RNA-Polymerase zuerst Nucleotide, eine Ribosomen-Bindestelle verschlüsselnd, dann eine Translationsinitiation oder "Start"-signal (gewöhnlich ATG, das in der entstehenden Messenger-RNA zu AUG wird), dann die Nucleotid-Codons innerhalb des Strukturgen selbst. Sogenannte Stop-Codons werden am Ende des Strukturgen transkribiert, worauf die Polymerase eine weitere Sequenz von Messenger-RNA bilden kann, die aufgrund der Anwesenheit des Stopsignals von den Ribosomen unübersetzt bleiben. Ribosomen werden 55 an die auf der messenger-RNA vorgesehene Bindestelle gebunden, in Bakterien gewöhnlich, wenn die mRNA gebildet wird, und erzeugen selbst das verschlüsselte Polypeptid, beginnend am Translations-Startsignal und endend mit dem zuvor genannten Stopsignal. Das gewünschte Produkt wird gebildet, wenn die die Ribosomen-Bindestelle verschlüsselnden Sequenzen bezüglich des AUG-Initiatorcodons geeignet angeordnet sind und wenn alle übrigen Codons dem Initiatorcodon in Phase folgen. Das anfallende Produkt kann durch Lyse der Wirtszelle 60 und Gewinnen des Produkts durch geeignete Reinigung von anderem Bakterienprotein erhalten werden.

Nucleotid-Sequenzstudien von Genen, die die verschiedenen Leukozyten-Interferone verschlüsseln, lassen ein

Maß an Allgemeinheit unter verschiedenen von ihnen im Hinblick auf die Gegenwart und Anordnung von Spaltstellen erkennen, die von bestimmten Restriktions-Endonucleasen erkannt werden. Erfindungsgemäß kann diese Allgemeinheit zur Bildung neuer Hybridgene durch DNA-Rekombination benutzt werden, die bei der mikrobiellen Erzeugung von Hybrid-Leukozyten-Interferonen brauchbar sind, von denen erwartet werden kann, daß sie in mehr oder weniger großem Ausmaß die antiviralen und andere Eigenschaften von Interferonen, durch die elterlichen Gene verschlüsselt, zeigen. Bei bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung können solche Hybrid-Leukozyten-Interferone verstärkte Aktivität relativ zu den durch die elterlichen Gene verschlüsselten entwickeln.

Die elterlichen Leukozyten-Interferon-Gene, die die Familie der hier betrachteten Leukozyten-Interferon-Proteine codieren, zeigen individuell natürliche allelomorphe Variationen. Diese Variationen können durch einen oder mehrere Aminosäure-Unterschied(e) in der Gesamtproteinsequenz oder durch Lücken, Substitutionen, Einfügungen, Umkehrungen oder zusätzliche Aminosäure(n) in der Sequenz nachgewiesen werden. Für jedes elterliche Leukozyten-Interferon, mit LeIF A, LeIF B . . . LeIF J usw. bezeichnet, fallen solche allelomorphen Variationen unter die Bezeichnung oder Definition und damit unter die Erfindung.

Weitere Aufgaben, Vorteile und Merkmale der Erfindung ergeben sich aus der folgenden näheren Beschreibung und den Figuren; von diesen zeigt:

Fig. 1a und 1b Nucleotidsequenzen der Codierbereiche von 8 Leukozyten-Interferon ("LeIF")-Komplementär-DNA ("cDNA")-Klonen. Von diesen ist eines, entsprechend mit LeIF E bezeichnet, ein offensichtliches "Pseudogen", das kein aktives Leukozyten-Interferon codiert, während ein weiteres, LeIF G, weniger als die volle Sequenz für die entsprechende Interferon-Art enthält. Das ATG-Translations-Startkodon und das Stop-Triplett für jedes LeIF ist unterstrichen.

Fig. 2 Restriktions-Endonuclease-Karten von acht Arten LeIF geklonter cDNAs (A bis H). Die Klone enthaltende Plasmide wurden nach der dC:dG-Tailingmethode aufgebaut (D. V. Goeddel et al., Nature 287, 411-416 (1980)). Daher können die cDNA-Inserte mit Pst I herausgeschnitten werden, d. h. jedes Ende eines jeden Inserts ist eine Pst I-Restriktions-Endonuclease-Spaltstelle. Die Striche am Ende eines jeden cDNA-Inserts stellen die flankierenden Homopolymer-dC:dG-Schwänze dar. Die Positionen von Pvu II-, Eco RI- und Bgl II-Restriktionsstellen sind angegeben. Schattierbereiche in der Figur stellen die Codiersequenzen ausgereifter LeIFs dar; die schraffierten Bereiche zeigen Signal-Peptidcodiersequenzen an; und die freien Bereiche zeigen nichtcodierende 3'- und 5'-Sequenzen.

Fig. 3a und 3b ist ein Vergleich der acht von den Nucleotid-Sequenzen vorausgesagten LeIF-Proteinsequenzen. Es werden die von der IUPAC-IUB Commission von Biochemical Nomenclature empfohlenen einbuchstabigen Abkürzungen verwendet: A = Alanin; C = Cystein; D = Asparaginsäure; E = Glutaminsäure; F = Phenylalanin; G = Glycin; H = Histidin; I = Isoleucin; K = Lysin; L = Leucin; M = Methionin; N = Asparagin; P = Prolin; Q = Glutamin; R = Arginin; S = Serin; T = Threonin; V = Valin; W = Tryptophan und Y = Tyrosin. Die Zahlen beziehen sich auf die Aminosäureposition (S bezieht sich auf Signalpeptid). Der Strich in der 165 Aminosäure-LeIF A-Sequenz an Position 44 wurde eingeführt, um diese Sequenz mit den 166 Aminosäuresequenzen der anderen LeIFs auszurichten. Die Sequenz von LeIF E wurde durch Ignorieren des Extra-Nucleotids (Position 187 der Fig. 1a) in seinem Codierbereich bestimmt. Die Sternchen bezeichnen In-Phase-Stop-Codons. Allen LeIFs (ausgenommen das Pseudogen LeIF E) gemeine Aminosäuren sind auch gezeigt. Die unterstrichenen Reste sind Aminosäuren, die auch in menschlichem Fibroblasten-Interferon vorhanden sind.

In Fig. 1a entsprechen die Nucleotide +1 bis 69 den S1 bis S23-Aminosäuren der Fig. 3a. Das Codon TGT (Nucleotide 70 bis 72) der Fig. 1a entspricht Cystein (C, Aminosäure 1) der Fig. 3a. In Fig. 3a tritt die Pvu II-Restriktions-Endonuclease-Spaltstelle zwischen den Codons für Aminosäuren 92 und 93 in LeIF A, B, D, F und G auf, d. h. zwischen den Nucleotiden 346 und 347 der Fig. 1a.

Fig. 4a und 4b vergleicht die Aminosäuresequenzen ausgereifter Leukozyten-Interferone A und D, wobei ein Fehlen der Aminosäure 44 in LeIF A durch Striche angezeigt ist. Nur solche LeIF D-Aminosäuren, die sich von den entsprechenden Aminosäuren von LeIF A unterscheiden, sind dargestellt: Die Aminosäuresequenz von LeIF D ist sonst mit der von LeIF A identisch. Fig. 4b zeigt auch die relative Stellung von Bgl II- und Pvu II-Restriktions-Endonuclease-Spaltstellen, zur Bildung bevorzugter Hybrid-Leukozyten-Gene nach der Erfindung verwendet, am entsprechenden Gen an.

Die Fig. 5 und 6 veranschaulichen die Ergebnisse von Vergleichstests eines bevorzugten Hybrid-Leukozyten-Interferons gemäß der Erfindung ("LeIF-A/D") auf Aktivität gegenüber Encephalomyocarditis-Virus ("EMC") und Vesicularstomatitis-Virus ("VSV") in Mausezellen.

Die Fig. 7 und 8 zeigen die Ergebnisse eines Vergleichstests mit LeIF-A/D und anderen Interferonen gegenüber EMC-Virus-Infektionen in Mäusen bzw. Hamstern. Die Daten in Fig. 7 stammen aus Behandlungen i. p. 3 h vor der Infektion. Die Dosierungen von LeIF-A/D und LeIF-A sind, wie an Wish-Zellen titriert.

Fig. 9a und 9b zeigt die DNA-Sequenzen von fünf LeIF-Proteinen einschließlich die Typen I und J.

Bei den beschriebenen Arbeiten wurden zwei Mikroorganismen eingesetzt: E. coli x 1776, wie in der US-PS 4 190 495 beschrieben, und E. coli K-12 Stamm 294 (Ende A, thi⁻, hsr⁻, hsm_K⁺), wie in der GB-PS 2 055 382A beschrieben. Beide sind bei der American Type Culture Collection, ATCC-Zugangsnummer

31537 und 31446, am 3. Juli 1979 bzw. 28. Oktober 1978 hinterlegt worden. Alle Arbeiten über rekombinante DNA erfolgten nach anwendbaren Richtlinien der National Institutes of Health.

Die Erfindung wird in ihren am meisten bevorzugten Ausführungsformen unter Bezugnahme auf *E. coli* beschrieben, nicht nur mit den oben beschriebenen Stämmen *E. coli* x 1776 und *E. coli* K-12, Stamm 294, sondern auch mit anderen bekannten *E. coli*-Stämmen, wie *E. coli* B, oder anderen Mikroben-Stämmen, von denen viele hinterlegt und (möglicherweise) von anerkannten Hinterlegungsstellen für Mikroorganismen, wie der American Type Culture Collection, ATCC, erhältlich sind. (Vgl. die ATCC-Katalogaufstellung und auch die DE-OS 2 644 432). Diese weiteren Mikroorganismen umfassen z. B. Bazillen, wie *Bacillus subtilis*, und andere Enterobacteriaceae, unter denen beispielsweise *Salmonella typhimurium* und *Serratia marcescens* erwähnt werden können, unter Verwendung von Plasmiden, die reduplizieren und heterologe Gensequenzen exprimieren können. Hefe, wie *Saccharomyces cerevisiae*, kann auch vorteilhaft als Wirtsorganismus bei der Herstellung der erfindungsgemäßen Interferonproteine durch Expression von sie codierenden Genen unter der Kontrolle eines Hefepromotors verwendet werden.

Die LeIF-Hybriden werden erfindungsgemäß hergestellt, indem die Restriktions-Endonuclease-Spaltstellen, die gewöhnlich in den einzelnen elterlichen Genen liegen, und deren jedes Ende in Verbindung mit den gleichen Stellen in Träger-Expressions-Plasmiden (Vektoren) genutzt werden. Beispielsweise kann das große (ca. 3900 bp) Fragment eines Xba I-Pst I-Verdauungsprodukts des pLeIF A trp 25-Expressionsplasmids mit Xba I-Pvu II- und Pvu II-Pst I-Verdauungsfragmenten der verschiedenen LeIF-Elterngene zu Expressionsplasmiden verbunden werden, die das entsprechende Hybrid-LeIF erhältlich machen.

Jedes LeIF-Expressionsplasmid wurde unabhängig mit Verdauungsfragmenten aufgebaut, die aus verschiedenen LeIF-Plasmiden isoliert waren, z. B. pLeIF A trp 25, pLeIF B trp 7, pLeIF C trp 35, pLeIF D trp 11, pLeIF F trp 1, pLeIF G, pLeIF H und pLeIF I usw., deren Aufbau in *Nature* 287, 411 (1980) beschrieben ist, oder aus pBR322, dessen Aufbau in *Gene* 2, 95 (1977) beschrieben ist. In bestimmten dieser Plasmide bezeichnet "trp" ein Tryptophanpromoter-Operator-System, für bakterielle Expression am meisten bevorzugt, wie in der veröffentlichten Europäischen Patentanmeldung Nr. 36 776 beschrieben.

Direkte Expression eines ersten reifen Leukozyten-Interferons

Die Arbeitsweise, die befolgt wurde, um LeIF A direkt als reifes Interferon-Polypeptid auszudrücken, umfaßte die Kombination von synthetischen (N-terminalen) und komplementären DNAs.

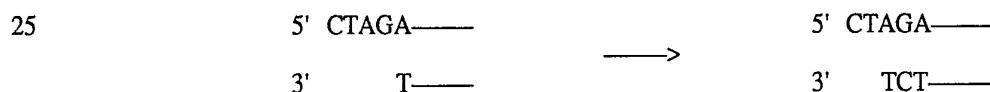
Eine Sau 3a-Restriktion-Endonuclease-Stelle wird passenderweise zwischen Codons 1 und 2 von LeIF A angeordnet. Zwei synthetische Desoxyoligonucleotide wurden geschaffen, die ein ATG-Translations-Startcodon aufweisen, das Codon für Aminosäure 1 (Cystein) wieder herstellen und ein Eco RI-kohäsives Ende schaffen. Diese Oligomeren wurden an ein 34 b.p. Sau 3a - Ava II-Fragment von pL31 geheftet. Das anfallende 45 b.p.-Produkt wurde an zwei weitere DNA-Fragmente gehängt, um ein 865-Basenpaar-synthetisch/natürliches Hybridgen aufzubauen, das LeIF A codiert und durch Eco RI- und Pst I-Restriktionsstellen gebunden wird. Dieses Gen wurde zwischen Eco RI und Pst I-Stellen in pBR322 eingefügt, um das Plasmid pLeIF A1 zu ergeben.

Das Plasmid pGM1 trägt das *E. coli*-Tryptophan-Operon mit der Fehlstelle ΔLE1413 (G. F. Miozzari et al., *J. Bacteriology* 133, 1457-1466 (1978)) und führt folglich zur Expression eines Fusionsproteins mit den ersten 6 Aminosäuren des trp-Leaders und etwa dem letzten Drittel des trp-E-Polypeptids (nachfolgend im Zusammenhang als LE' bezeichnet) sowie das trp-D-Polypeptid in seiner Gesamtheit, alle unter der Kontrolle des trp-Promoter-Operator-Systems. 20 µg des Plasmids wurden mit dem Restriktionsenzym Pvu II verdaut, das das Plasmid an fünf Stellen spaltet. Die Genfragmente wurden sodann mit EcoRI-Verknüpfern (bestehend aus einem selbst-komplementären Oligonucleotid der Sequenz pCATGAATTCATG) unter Bildung einer EcoRI-Spaltstelle für ein späteres Klonen zu einem Plasmid mit einer EcoRI-Stelle kombiniert. Die 20 µg der aus pGM1 erhaltenen DNA-Fragmente wurden mit 10 Einheiten T₄-DNA-Ligase in Gegenwart von 200 pico-Mol des 5'-phosphorylierten synthetischen Oligonucleotids pCATGAATTCATG und in 20 µl T₄-DNA-Ligase-Puffer (20 mMol Tris, pH 7,6, 0,5 mMol ATP, 10 mMol MgCl₂, 5 mMol Dithiothreitol) bei 4 °C über Nacht behandelt. Die Lösung wurde dann 10 min auf 70 °C erwärmt, um das Binden aufzuhalten. Die Bindeglieder wurden durch EcoRI-Abbau gespalten und die Fragmente, nun mit EcoRI-Enden, wurden mittels 5 % Polyacrylamidgel-Elektrophorese (nachfolgend "PAGE") aufgetrennt und die drei größten Fragmente vom Gel zunächst durch Anfärben mit Ethidiumbromid, Lokalisieren der Fragmente mit UV-Licht und Herausschneiden der interessierenden Teile aus dem Gel isoliert. Jedes Gelfragment wurde mit 300 µl 0,1 x TBE in einen Dialysebeutel gebracht und bei 100 V 1 h in 0,1 x TBE-Puffer der Elektrophorese unterworfen (TBE-Puffer enthält 10,8 g Tris-Base, 5,5 g Borsäure, 0,09 g Na₂EDTA in 1 l H₂O). Die wäßrige Lösung wurde aus dem Dialysebeutel geholt, mit Phenol extrahiert, mit Chloroform extrahiert und 0,2-molar an Natriumchlorid gemacht und die DNA nach Äthanol-Fällung in Wasser gewonnen. Das trp-Promoter-Operator-haltige Gen mit EcoRI-kohäsiven Enden wurde in der nachfolgend beschriebenen Arbeitsweise identifiziert, die den Einbau von Fragmenten in ein Tetracyclin-empfindliches Plasmid zur Folge hat, das nach dem Einbau von Promoter-Operator Tetracyclin-resistent wird.

Das Plasmid pBRH1 (R. I. Rodriguez et al., Nucleic Acids Research 6, 3267-3287 (1979)) drückt Ampicillin-Resistenz aus und enthält das Gen für Tetracyclin-Resistenz, da aber kein zugeordneter Promoter vorliegt, kommt diese Resistenz nicht zum Ausdruck. Das Plasmid ist folglich Tetracyclin-empfindlich. Durch Einführen eines Promoter-Operator-Systems an der EcoRI-Stelle kann das Plasmid Tetracyclin-resistent gemacht werden.

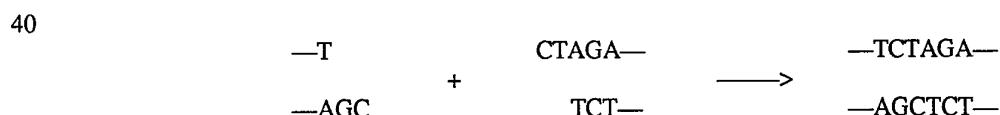
5 Ein pBRH1 wurde mit EcoRI verdaut und das Enzym durch Phenolextraktion und anschließende Chloroform-Extraktion entfernt und nach Äthanolfällung in Wasser gewonnen. Das anfallende DNA-Moleköl wurde in getrennten Reaktionsgemischen jeweils mit den drei oben erhaltenen DNA-Fragmenten kombiniert und mit T4-DNA-Ligase, wie zuvor beschrieben, verknüpft. Die im Reaktionsgemisch vorliegende DNA wurde zum Transformieren eines angemessenen *E. coli*-K-12-Stammes 294 (K. Backman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 10 73, 4174-4198 (1976)) nach Standard-Techniken (V. Hershfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3455-3459 (1974)) verwendet und die Bakterien auf LB-Platten aufgebracht, die 20 µg/ml Ampicillin und 5 µg/ml Tetracyclin enthielten. Mehrere Tetracyclin-resistente Kolonien wurden ausgewählt, Plasmid DNA isoliert und die Anwesenheit des gewünschten Fragments durch Restriktions-Enzymanalyse bestätigt. Das anfallende Plasmid wird mit pBRHtrp bezeichnet.

15 Ein EcoRI- und BamHI-Abbauprodukt des viralen Genoms oder Chromosomensatzes von Hepatitis B wurde nach herkömmlichen Maßnahmen erhalten und zu EcoRI und BamHI-Stellen von Plasmid pGH6 (D. V. Goeddel et al., *Nature* 281, 544 (1979)) zu dem Plasmid pHs32 geklonnt. Das Plasmid pHs32 wurde mit XbaI gespalten, mit Phenol extrahiert, mit Chloroform extrahiert und mit Äthanol gefällt. Dann wurde es mit 1 µl E. coli-Polymerase I, Klenow-Fragment (Boehringer, Mannheim) in 30 ml Polymerase-Puffer (50 mMol Kaliumphosphat, pH 7,4, 7 mMol MgCl₂, 1 mMol β-Mercaptoäthanol) mit 0,1 mMol dTTP und 0,1 mMol dCTP 30 min bei 0 °C, dann 2 h bei 37 °C behandelt. Diese Behandlung führt dazu, daß zwei der vier Nucleotide komplementär zu dem vorragenden 5'-Ende der XbaI-Spaltstelle aufgefüllt wurden in:



30 Zwei Nucleotide, dC und dT, wurden eingeführt und bildeten ein Ende mit zwei vorragenden 5'-Nucleotiden. Dieser lineare Rest von Plasmid pHs32 (nach Phenol- und Chloroform-Extraktion und Rückgewinnung in Wasser nach Äthanol-Fällung) wurde mit EcoRI gespalten. Das große Plasmid-Fragment wurde vom kleineren EcoRI-XbaI-Fragment durch PAGE getrennt und nach Elektroelution isoliert. Dieses DNA-Fragment aus pHs32 (0,2 µg) wurde unter Bedingungen ähnlich den oben beschriebenen an das EcoRI-Taq I-Fragment des Tryptophan-Operons (ca. 0,01 µg), aus pBRHtrp stammend, gebunden.
35

Bei dem Verfahren zum Binden des Fragments von pHS32 an Eco RI-Taq I-Fragment, wie oben beschrieben, wird das vorragende Taq I-Ende an das verbleibende vorragende Ende von XbaI gebunden, obgleich es nicht vollständig nach Watson-Crick Basen-gepaart ist:



45 Ein Teil dieses Binde-Reaktionsgemisches wurde in *E. coli* 294-Zellen transformiert, wärmebehandelt und auf Ampicillin enthaltende LB-Platten gebracht. 24 Kolonien wurden ausgewählt, in 3 ml LB-Medium vermehrt und Plasmid isoliert. Bei sechs von ihnen wurde festgestellt, daß die *Xba*I-Stelle durch *E. coli*-katalysierte DNA-Reparatur und Replikation regeneriert war:



Auch wurde gefunden, daß diese Plasmide sowohl mit EcoRI als auch mit HpaI spalteten und die erwarteten Restriktionsfragmente ergaben. Ein Plasmid, als pTrp 14 bezeichnet, wurde zur Expression heterologer Polypeptide verwendet, wie nachfolgend erörtert.

60 Das Plasmid pHGH 107 (D. V. Goeddel et al., *Nature* **281**, 544 (1979)) enthält ein Gen für menschliches Wachstumshormon aus 23 Aminosäurecodons, hergestellt aus synthetischen DNA-Fragmenten und 163

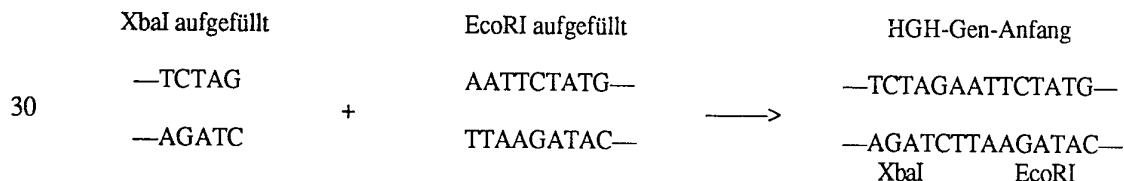
5 Aminosäurecodons, erhalten aus Komplementär-DNA, hergestellt über reverse Transkription von menschlicher Wachstumshormon-messenger-RNA. Dieses Gen enthält, obgleich die Codons der "Vor"-Sequenz von menschlichem Wachstumshormon fehlen, ein ATG-Translations-Startcodon. Das Gen wurde aus 10 µg pHGH 107 nach Behandlung mit EcORI und dann E. coli-Polymerase-I-Klenow-Fragment und dTTP und dATP, wie oben beschrieben, isoliert. Nach Phenol- und Chloroformextraktion und Äthanolfällung wurde das Plasmid mit BamHI behandelt.

Das Human-Wachstumshormon ("HGH")-Gen-enthaltende Fragment wurde durch PAGE isoliert, dann folgte Elektroelution. Das anfallende DNA-Fragment enthält auch die ersten 350 Nucleotide des Tetracyclin-resistenten Strukturgens, ihm fehlt aber das Tetracyclin-Promoter-Operator-System, so daß beim anschließenden Klonen zu einem Expressionsplasmid die das Insert enthaltenden Plasmide durch die Wiederherstellung der Tetracyclin-Resistenz lokalisiert werden können. Da das EcoRI-Ende des Fragments durch die Klenow-Polymerase I-Arbeitsweise aufgefüllt worden ist, hat das Fragment ein stumpfes und ein kohäatives Ende, was die richtige Orientierung bei späterem Einschieben in ein Expressionsplasmid gewährleistet.

15 Sodann wurde das Expressionsplasmid pTrp14 hergestellt, um das oben hergestellte HGH-Gen-haltige Fragment zu erhalten. So wurde pTrp14 mit XbaI verdaut und die erhaltenen kohäsiven Enden nach der Klenow-Polymerase I-Arbeitsweise unter Verwendung von dATP, dTTP, dGTP und dCTP gefüllt. Nach der Phenol- und Chloroformextraktion und der Äthanolfällung wurde die anfallende DNA mit BamHI behandelt, und das anfallende große Plasmid-Fragment wurde durch PAGE und Elektroelution isoliert. Das aus pTrp14 abgeleitete Fragment hatte ein stumpfes und ein kohäsives Ende, was die Rekombination in geeigneter Orientierung mit dem das HGH-Gen enthaltenden Fragment, zuvor beschrieben, erlaubt.

Das HGH-Gen-Fragment und das pTrp14 Δ Xba-BamHI-Fragment wurden kombiniert und unter ähnlichen Bedingungen, wie oben beschrieben, aneinander gehängt. Die aufgefüllten XbaI- und EcoRI-Enden verbanden sich miteinander über die Verbindung über die stumpfen Enden unter Rückbildung sowohl der XbaI- als auch der EcoRI-Stelle:

25



35 Dieser Aufbau bildet auch wieder das Tetracyclin-resistente Gen zurück. Da das Plasmid pHGH 107 Tetracyclin-Resistenz von einem Promoter vor dem HGH-Gen (dem Lac-Promoter) exprimiert, ermöglicht dieser Aufbau, mit pHGH 207 bezeichnet, die Expression des Gens für Tetracyclin-Resistenz unter der Kontrolle des Tryptophan-Promoter-Operators. So wurde das Bindegemisch in *E. coli* 294 transformiert und Kolonien auf LB-Platten, die 5 µg/ml Tetracyclin enthielten, selektiert.

40 Das Plasmid pHGH207 wurde mit Eco RI verdaut und der trp-Promoter, ein 300 b.p. Eco RI-Fragment enthaltend, durch PAGE und anschließende Elektroelution gewonnen. Das 300 b.p. Eco RI-Fragment enthält den E. coli-trp-Promoter, Operator und trp-Leaderribosomen-Bindestelle, ihm fehlt aber eine ATG-Sequenz für das Einführen der Translation. Dieses DNA-Fragment wurde in die Eco RI-Stelle von pLE-IF A geklont.

Das eben erwähnte trp-Fragment ist ein Analogon des *E. coli*-Tryptophan-Operons, dessen sogenannter trp-Abschwächer beseitigt worden ist, um Expressionswerte kontrollierbar zu erhöhen. Expressionsplasmide, die das modifizierte trp-Regulon enthalten, können in Nährmedien, die zusätzliches Tryptophan in genügenden Mengen zum Unterdrücken des Promoter-Operator-Systems enthalten, bis auf vorbestimmte Werte vermehrt werden, dann von Tryptophan befreit werden, um das System von Repressor zu befreien, und die Expression des gewünschten Produkts veranlassen.

50 Im einzelnen wurden 250 µg Plasmid pL31 mit Pst I verdaut und das 1000 b.p.-Insert durch Gelelektrophorese an einem 6 %-Polyacrylamidgel isoliert. Etwa 40 µg Insert wurden aus dem Gel elektroeluiert und in drei Teilmengen zu weiterem Aufschluß unterteilt: a) eine 16 µg-Probe dieses Fragments wurde mit 40 Einheiten Bgl II 45' bei 37 °C teilweise verdaut und das Reaktionsgemisch an einem 6 %-Polyacrylamidgel gereinigt. Etwa 2 µg des gewünschten 670 b.p.-Fragments wurden gewonnen. b) Eine weitere Probe (8 µg) des 1000 b.p.-Pst I-Inserts wurde mit Ava II und Bgl II behandelt. 1 µg des angegebenen 150 b.p.-Fragments wurde nach Gelelektrophorese gewonnen. c) 16 µg des 1000 b.p.-Stücks wurden mit Sau 3a und Ava II behandelt. Nach Elektrophorese an einem 10 %-Polyacrylamidgel wurden etwa 0,25 µg (ca. 10 pMol) des 34 b.p.-Fragments gewonnen. Die zwei angegebenen Desoxyoligonucleotide, 5'-dAATTCACTGTGT (Fragment 1) und 5'-dGATCACACATG (Fragment 2) wurden nach der Phosphotriester-Methode (Maxam und Gilbert, Methods Enzymol. 65, 499-560 (1980)) synthetisiert. Das Fragment 2 wurde wie folgt phosphoryliert. 200 µl (ca. 40 pMol) (γ ³²P) ATP (Amersham, 5000 Ci/mMol) wurden durchgetrocknet und erneut in 30 µl 60 mmol.

Tris-HCl (pH 8), 10 mmol. MgCl₂, 15 mmol. β -Mercaptoäthanol, 100 pMol DNA-Fragment und 2 Einheiten T4-Polynucleotidkinase enthaltend, suspendiert. Nach 15 min bei 37 °C wurde 1 μ l 10 mmol. ATP zugesetzt und die Reaktion weitere 15 min ablaufen gelassen. Das Gemisch wurde dann 15 min auf 70 °C erwärmt, mit 100 pMol 5'-OH-Fragment 1 und 10 pMol des 34 b.p.-Sau 3a-Ava II-Fragments zusammengebracht. Das Binden erfolgte 5 h bei 4 °C in 50 μ l 20 mmol. Tris-HCl (pH 7,5), 10 mmol. MgCl₂, 10 mmol. Dithiothreitol, 0,5 mmol. ATP und 10 Einheiten T4-DNA-Ligase. Das Gemisch wurde an einem 6-Polyacrylamidgel elektrophoretisch behandelt, und das 45 b.p.-Produkt durch Elektroelution gewonnen. 860.000 Cerenkov-cpm wurden gewonnen (ca. 30 ng, 1 pMol) kombiniert mit 0,5 μ g (5 pMol) des 150 b.p.-Ava II-Bgl II-Fragments und 1 μ g (2 pMol) des 670 b.p.-Bgl-II-Pst-I-Fragments. Das Binden erfolgte bei 20 °C 16 h unter Verwendung von 20 Einheiten T4-DNA-Ligase. Die Ligase wurde durch 10minütiges Erwärmen auf 65 °C inaktiviert. Das Gemisch wurde dann mit Eco RI und Pst I zum Beseitigen von Polymeren des Gens verdaut. Das Gemisch wurde durch 6 % Polyacrylamidgel-Elektrophorese gereinigt. 36.000 cpm (ca. 0,04 pMol, 20 ng) 865 b.p.-Produkt wurden isoliert. Die Hälfte hiervon (10 ng) wurde an pBR322 (0,3 μ g) zwischen Eco RI und Pst I-Stellen gebunden. Die Transformation von *E. coli* 294 ergab 70 Tetracyclin-resistente Ampicillin-empfindliche Transformanten. Aus 18 dieser Transformanten isolierte Plasmid-DNA wurde mit Eco RI und Pst I verdaut. 16 der 18 Plasmide hatten ein Eco RI-Pst I-Fragment von 865 b.p. Länge. 1 μ g von einem von diesen, pLe-IF A1, wurde mit Eco RI verdaut und an ein 300 b.p. Eco RI-Fragment (0,1 μ g), das *E. coli*-trp-Promoter und trp-Leader-Ribosomen-Bindestelle enthielt, hergestellt wie oben beschrieben, gebunden. Den trp-Promoter enthaltende Transformanten wurden mit einer ³²P-trp-Sonde nach der Grunstein-Hogness-Kolonie-Screening-Methode identifiziert - Grunstein et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 72, 3961 (1975)). Eine asymmetrisch angeordnete Xba-I-Stelle im trp-Fragment erlaubte die Bestimmung von Rekombinanten, in denen der trp-Promoter in Richtung des Le-IF-A-Gens orientiert war.

Extrakte wurden für den IF-Assay wie folgt hergestellt: 1 ml Kulturen wurden in L-Brühe mit 5 μ g/ml Tetracyclin zu einem A₅₅₀ von etwa 1,0 gezüchtet, dann in 25 ml M9-Medien mit 5 μ g/ml Tetracyclin verdünnt. 10 ml-Proben wurden durch Zentrifugieren gewonnen, wenn A₅₅₀ 1,0 erreichte, und Zellkuchen wurden in 1 ml 15%iger Saccharose, 50 mmol. Tris-HCl (pH 8,0), 50 mmol. EDTA suspendiert. 1 mg Lysozym wurde zugesetzt, und nach 5 min bei 0 °C wurden die Zellen durch Beschallung aufgebrochen. Die Proben wurden 10 min bei 15.000 UpM in einem Sorvall-SM-24-Rotor zentrifugiert. Die Interferon-Aktivität in den überstehenden Flüssigkeiten wurde durch Vergleich mit Le-IF-Standards mit Hilfe des Hemmtests des cytopathischen Effekts (CPE) bestimmt. Zur Bestimmung der Zahl der IF-Moleküle pro Zelle wurde eine Le-IF-spezifische Aktivität von 4×10^8 Einheiten/mg verwendet (Rubinstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 640 (1979)).

Der Klon pLe-IF-A-trp 25, in den der trp-Promoter in der gewünschten Orientierung eingesetzt worden war, ergibt hohe Aktivitätswerte (sogar $2,5 \times 10^8$ Einheiten/l). Das von *E. coli* K12-Stamm 294/pLe-IF A-trp 25 gebildete IF verhält sich wie authentisches Human-Le-IF; es ist gegenüber einer Behandlung bei pH 2 stabil und wird durch Kaninchen-Antihuman-Leukozyten-Antikörper neutralisiert. Das Interferon hat ein wahrnehmbares Molekulargewicht von etwa 20.000.

Die Isolierung von cDNAs für weitere Leukozyten-Interferone

DNA aus dem vollständig charakterisierten Le-IF A cDNA-haltigen Plasmid wurde mit Pst I herausgeschnitten, elektrophoretisch isoliert und nach einer veröffentlichten Arbeitsweise (Taylor et al., Biochem. Biophys. Acta. 442, 324 (1976)) mit ³²P markiert. Die radioaktiv markierte DNA wurde als Sonde für das Screening weiterer *E. coli* 294-Transformanten durch ein in situ-Kolonie-Testverfahren, Grunstein et al., wie oben, verwendet. Kolonien wurden isoliert, die mit der Sonde in unterschiedlichen Mengen hybridisierten. Plasmid-DNA aus diesen Kolonien und die oben erwähnten 10 hybridisierenden Kolonien wurde durch Herausschneiden mit Pst isoliert und nach drei verschiedenen Methoden charakterisiert. Zuerst wurden diese Pst-Fragmente durch ihre Restriktions-Endonuclease-Abbaumuster mit den Enzymen Bgl II, Pvu II und Eco RI charakterisiert. Diese Analyse erlaubte die Klassifizierung von wenigstens 8 verschiedenen Typen (Le-IF A, Le-IF B, Le-IF C, Le-IF D, Le-IF E, Le-IF F, Le-IF G und Le-IF H), was der Lokation verschiedener Restriktionsschnitte relativ zu der derzeit bekannten Vorsequenz und Codiersequenz von Le-IF A nahekommt. Einer von diesen, Le-IF D, ist vermutlich identisch mit dem von Nagata et al., Nature 284, 316 (1980) beschriebenen.

Sodann wurden bestimmte der DNAs nach einem veröffentlichten Hybridisierungs-Auswahltest, Cleveland et al., Cell 20, 95 (1980), auf ihr Vermögen zur selektiven Entfernung von Le-IF mRNA aus Poly-A-haltiger KG-1-Zell-RNA getestet. Bei diesem Test waren Le-IF A, B, C und F positiv. Drittens wurden die letzteren Pst-Fragmente in ein Expressionsplasmid insertiert, *E. coli* 294 mit dem Plasmid exprimiert und die Fragmente ausgedrückt. Die Expressionsprodukte, vermutlich Vor-Interferone, waren alle positiv beim CPE-Test auf Interferon-Aktivität, wenngleich nur am Rande aktiv im Falle des Le-IF-F-Fragments. Außerdem wurden alle beschriebenen Le-IF-Typen in Sequenzen aufgeteilt.

Zweites reifes Leukozyten-Interferon

Die Sequenz des isolierten Fragments mit dem Gen für reifes Le-IF-B zeigt, daß die ersten 14 Nucleotide der Typen A und B identisch sind. Wir schlugen daher vor, ein Fragment aus pLe-IF A 25 zu isolieren, das den trp-Promoter-Operator, Ribosomen-Bindestelle und den Beginn des Le-IF (A = B)-Gens trägt, und dieses mit dem übrigen Teil der B-Sequenz in einem Expressionsplasmid zu kombinieren.

Um das etwa 950 b.p. Sau 3a - Pst I-Fragment aus der in Fig. 7a dargestellten Sequenz zu erhalten, waren mehrere Schritte nötig aufgrund des Vorliegens einer oder mehrerer störender Sau 3a-Restriktionsstellen, d. h.:

1. Die folgenden Fragmente wurden isoliert:

- 10 a) 110 b.p. aus Sau 3a - Eco RI;
 - b) 132 b.p. aus Eco RI - Xba;
 - c) über 700 b.p. aus Xba - Pst.
- 15 2. Die Fragmente (1a) und (1b) wurden gebunden und mit Xba und Bgl-II geschnitten, um Selbstpolymerisation durch Sau 3a und Xba-Endstellen auszuschließen (die relevante Sau 3a-Stelle war innerhalb einer Bgl II-Stelle; Bgl II-Schnitte hinterlassen ein Sau 3a-kohäsives Ende). Ein 242 b.p.-Fragment wurde isoliert.
- 20 3. Die Produkte von (2) und (1c) wurden verbunden und mit Pst I und Bgl II geschnitten, wiederum, um Selbstpolymerisation zu verhindern. Ein Fragment von etwa 950 b.p., Sau 3a - Pst I, wurde isoliert. Dieses Fragment umfaßte den Teil des Le-IF-B-Gens, den Le-IF A nicht hatte.
- 25 4. Ein etwa 300 b.p.-Fragment (Hind III - Sau 3a) mit trp-Promoter-Operator, Ribosomen-Bindestelle, ATG-Startsignal und Cysteincodon von Le-IF A wurde aus pLe-IF A 25 isoliert.
5. Ein etwa 3600 b.p.-Fragment Pst I - Hind III wurde aus pBr 322 isoliert. Dies umfaßte das Replikon und codierte die Tetracyclin-, nicht aber Ampicillin-Resistenz.
- 25 6. Die in den Stufen 3, 4 und 5 erhaltenen Fragmente wurden dreifach verbunden und mit diesem Plasmid E. coli K-12-Stamm 294 transformiert.

30 Kleine Mengen Transformanten wurden minigetestet, Birnboim et al., Nucleic Acid Research 7, 1513 (1979), und Plasmid-Proben wurden mit Eco RI verdaut. Das verdaute Material lieferte 3 Fragmente, charakteristisch für

- 1) das Eco-RI-Eco RI-trp-Promoter-Fragment;
- 2) das innere Eco RI - Eco RI-Fragment von pL4; und
- 3) das Fragment vom Protein-Translations-Startsignal bis zur Eco RI-Spaltstelle von pL4.

35 Beim CPE-Test ergeben bakterielle Extrakte von Klonen, hergestellt in der obigen Weise, typischerweise Testwerte von etwa 10×10^6 Einheiten Interferon-Aktivität pro 1 bei $A_{550} = 1$. Ein so hergestellter repräsentativer Klon ist 294/pLIF B trp 7.

Weitere reife Leukozyten-Interferone

40 Weitere Gen-Fragmente voller Länge, die andere Le-IF-Typen haben, können maßgeschneidert und in Expressionsträger zur Expression, wie im Falle von Le-IF A, gebracht werden. Vollständige Sequenzauflärung nach herkömmlichen Maßnahmen wird zeigen, ob eine Restriktionsstelle nahe genug dem ersten Aminosäurecodon des reifen Interferon-Typs liegt, um eine bequeme Zuflucht zu der Lösung zu ermöglichen, die Beseitigung der Vorsequenz durch Restriktionsschnitt und Ersatz der Codons aminoendständig zusammen mit der Vorsequenz verlorengegangenen Aminosäurecodons durch Anhängen eines synthetischen DNA-Fragments, wie oben beschrieben, anzuwenden. Geht dies nicht, kann die oben beschriebene Arbeitsweise von Kleid et al. angewandt werden. Kurz zusammengefaßt gehört hierzu die Spaltung des die Vorsequenz enthaltenden Fragments genau vor dem Punkt, an dem der Codon für die erste Aminosäure des reifen Polypeptids beginnt, und zwar durch

- 50 1. Umwandeln der doppelsträngigen DNA in Einzelstrang-DNA in einem Bereich um diesen Punkt herum;
- 2. Hybridisieren des in Stufe 1 gebildeten Einzelstrang-Bereichs mit einer komplementären Starter-Sequenz von Einzelstrang-DNA, wobei das 5'-Ende des Starters dem Nucleotid gegenüberliegt, das an die beabsichtigte Spaltungsstelle grenzt;
- 55 3. Wiederherstellung des Teils des zweiten Stranges, in Stufe 1 eliminiert, der in 3'-Richtung des Starters liegt, durch Reaktion mit DNA-Polymerase in Gegenwart von Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin enthaltenden Desoxynucleotid-triphosphaten und
- 4. Abbauen der verbleibenden Einzelstranglänge der DNA, die über den gewünschten Spaltungspunkt hinwegreicht.

60

Ein kurzes Stück synthetischer DNA, das am 3'-Ende des codierenden Stranges mit dem Translations-Startsignal ATG endet, kann dann, z. B. durch Verbinden mit dem stumpfen Ende, an das anfallende maßgeschneiderte Gen für die reifen Interferone gebunden werden, und das Gen in ein Expressionsplasmid eingesetzt und unter die Kontrolle eines Promoters und die zugehörige Ribosomen-Bindestelle gebracht werden.

5 Ähnlich wie oben wurden Genfragmente mit Codierung für Le-IF-C und Le-IF-D in geeigneter Weise für direkte bakterielle Expression aufgebaut. Die Expressionsstrategie für diese zusätzlichen Leukozyten-Interferone beinhaltete in jedem Falle den Rückgriff auf das etwa 300 b.p.-Fragment (Hind III - Sau 3a) mit dem trp-Promoter-Operator, Ribosomen-Bindestelle, ATG-Startsignal und Cysteincodon von Le-IF A von pLe-IF A25. Hiermit wurden Genfragmente aus weiteren Interferongenen kombiniert, die ihre jeweiligen Aminosäure-Sequenzen über das allen gemeine anfängliche Cystein hinaus codieren. Jedes anfallende Plasmid wurde zur Transformation von *E. coli* K-12 Stamm 294 verwendet. Bindungen zur Bildung der jeweiligen Gene waren wie folgt:

Le IF-C

15 Man isoliert die folgenden Fragmente aus pLe IF-C:

- (a) 35 b.p. von Sau 3a bis Sau 96
- (b) 900 b.p. Sau 96 bis Pst I
- (c) Man isoliert ein etwa 300 b.p.-Fragment (Hind III-Sau 3a) aus pLe IF A-25 wie in Teil N (4) oben.
- (d) Man isoliert das etwa 3600 b.p.-Fragment von Teil N (5) oben.

Konstruktion

- 1) Man verknüpft (a) und (c). Man spaltet mit Bgl II, Hind III und isoliert das Produkt von etwa 335 b.p. (Basenpaaren).
- 2) Dreifachverknüpfung von 1) + (b) + (d) und Transformieren von *E. coli* mit dem erhaltenen Plasmid.

Ein so hergestellter repräsentativer Klon ist *E. coli* K-12 Stamm 294/pLe IF C trp 35.

Le-IF D

Man isoliert aus pLe IF-D:

- (a) 35 b.p. von Sau 3a bis Ava II
- (b) 150 b.p. von Ava II bis Bgl II
- (c) ca. 700 b.p. von Bgl II bis Pst I

Man isoliert aus pLe IF A25:

- (d) 300 b.p. von Hind III bis Sau 3a

40 Man isoliert aus PBr 322:

- (e) etwa 3600 b.p. von Hind III bis Pst I

Konstruktion

- 1) Man verknüpft (a) + (b), spaltet mit Bgl II und reinigt: 185 b.p.-Produkt (1).
- 2) Man verknüpft 1) + (d), spaltet mit Hind III, Bgl II und reinigt das ca. 500 b.p.-Produkt (2).
- 3) Man verbindet (2) + (c) + (e) und transformiert *E. coli* mit dem anfallenden Plasmid.

50 Ein so hergestellter repräsentativer Klon ist *E. coli* K-12 Stamm 294/pLeIF D trp 11.

Le-IF F

Das Le-IF F enthaltende Fragment kann zur direkten Expression durch Wiederzusammensetzen zurechtgeschnitten werden, bequem gemacht durch die vollständige Homologie von Aminosäuren 1-13 von Le-IF B und Le-IF F. Ein trp-Promoter-haltiges Fragment (a) mit geeignet konfigurierten Enden wird aus pHGH 207, oben beschrieben, über Pst I und Xba I-Behandlung mit anschließender Isolierung des ca. 1050 b.p.-Fragments erhalten. Ein zweites Fragment (b) wird als größeres der Fragmente aus dem Pst I und Bgl II-Abbau des Plasmids pHky 10 erhalten, ein Derivat von pBR322, das eine Bgl II-Stelle zwischen dem Tetracyclin-resistenten Promoter und dem Strukturgen enthält. Fragment (a) enthält etwa die Hälfte des die Ampicillin-Resistenz codierenden

Gens; Fragment (b) enthält den Rest jenes Gens und das gesamte Gen für die Tetracyclin-Resistenz, ausgenommen den zugehörigen Promoter. Die Fragmente (a) und (b) werden über T4-Ligase kombiniert und das Produkt mit Xba I und Bgl II behandelt, um Dimerisierung zu beseitigen, was zu einem Fragment (c) mit dem trp-Promoter-Operator und Genen für Tetracyclin-und Ampicillin-Resistenz führt.

5 Ein Fragment (d) von etwa 580 b.p. wird über Ava II und Bgl II-Abbau von pLe IF-F erhalten. Es weist Codons für Aminosäuren 14 - 166 von Le-IF F auf.

Ein Fragment (e) (49 b.p.) wird durch Xba I und Ava II-Abbau von pLe-IF B erhalten. Fragment (e) codiert die Aminosäuren 1 - 13 von Le-IF F.

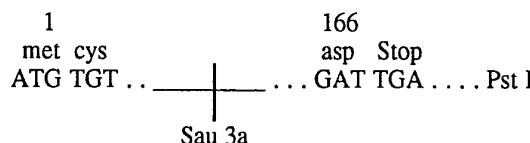
10 Fragmente (c), (d) und (e) werden in Gegenwart von T4-Ligase dreifach verbunden. Die aneinanderhängenden Enden der jeweiligen Fragmente sind so, daß das zusammengesetzte Plasmid korrekt gebildet wird, wobei das Tetracyclin-Resistenz-Gen unter die Kontrolle des trp-Promoter-Operators zusammen mit dem Gen für reifes Le-IF F gebracht wird, so daß mit dem gewünschten Plasmid transformierte Bakterien auf Tetracyclin-haltigen Platten ausgewählt werden können. Ein so hergestellter repräsentativer Klon ist E. coli K-12 Stamm 294 pLeIF F trp 1.

15

Le-IF H

Das vollständige Le-IF H-Gen kann wie folgt zur Expression als ausgereiftes Leukozyten-Interferon konfiguriert werden:

- 20 1. Plasmid-pLe-IF-H wird dem Hae II- und Rsa I-Abbau Isolierung des 816-Basenpaar-Fragments, das von der Signalpeptid-Aminosäure 10 bis zum 3'-nichtcodierenden Bereich reicht, unterworfen.
2. Das Fragment wird denaturiert, und der Reparatursynthese mit Klenow-Fragment unterworfen, Klenow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 168 (1970), wobei das synthetische Desoxyribonucleotid-Starter 5'-dATG TGT AAT CTG TCT verwendet wird. Diese allgemeine Arbeitsweise wird auch von Goeddel et al., US-SN 190 799 (25. 9. 1980) beschrieben.
- 25 3. Das anfallende Produkt wird mit Sau 3a gespalten und ein 452-Basenpaar ("bp")-Fragment, das die Aminosäuren 1 - 150 darstellt, wird isoliert.
4. Sau 3a- und Pst I-Abbau von pLeIF H und Isolierung des anfallenden 500 b.p.-Fragments liefert ein Gen, das die Aminosäuren 150 bis zum Ende der codierenden Sequenz codiert.
- 30 5. Die in den Stufen (3) und (4) isolierten Fragmente werden zum folgenden Fragment miteinander verknüpft:



40

das die 166 Aminosäuren von Le-IF H codiert.

6. pLeIF A trp 25 wird mit Xba I aufgeschlossen, mit DNA-Polymerase I mit stumpfem Ende versehen und das Produkt mit Pst I abgebaut. Das große anfallende Fragment kann mit dem Produkt der Stufe (5) zu einem Expressions-Plasmid verknüpft werden, das nach Transformation von E. coli K-12 Stamm 294 oder anderen Wirtsbakterien reifes Le-IF H zu exprimieren vermag.

LeIF-I

Die von Lawn et al., Cell 15, 1157 (1978) konstruierte Genbibliothek des menschlichen Genoms im Phagen λ Charon 4A wurde nach Leukozyten-Interferon-Genen durch von Lawn et al., oben, und Maniatis et al., Cell 15, 687 (1978) beschriebenen Arbeitsweisen durchsucht. Eine radioaktive LeIF-Sonde, aus der cDNA, Klon LeIF A, stammend (Goeddel et al., Nature 287, 411 (1980)), wurde verwendet, um etwa 500.000 Plaques zu prüfen. Dabei wurden 6 LeIF-Genom-Klone erhalten. Nach erneutem Screening und Plaque-Reinigung wurde einer dieser Klone, HLeIF2, zur weiteren Analyse ausgewählt.

Nach dem oben beschriebenen Verfahren können weitere Sonden vorteilhaft zur Isolierung zusätzlicher LeIF-Klone aus dem Human-Genom verwendet werden. Diese wiederum können zur Herstellung weiterer Leukozyten-Interferon-Proteine gemäß der Erfindung eingesetzt werden.

60

1. Das 2000 Basenpaar-Eco RI-Fragment des Genom-Klons (λ HLeIF2) wurde an der Eco RI-Stelle in pBR325 nochmals kloniert. Das anfallende Plasmid LeIF I wurde mit Eco RI gespalten und das 2000 Basenpaar-Fragment isoliert. Das Desoxyribonucleotid dAATTCTGCAG (ein Eco RI > Pst I-

Konverter) wurde an das 2000 Basenpaar-Eco RI-Fragment geknüpft und das anfallende Produkt mit Pst I zu einem 2000 Basenpaar-Fragment mit Pst I-Enden gespalten. Dies wurde mit Sau 96 gespalten und ein 1100 Basenpaar-Fragment isoliert, das ein Pst I-Ende und ein Sau 96-Ende aufweist.

- 5 2. Das Plasmid pLeIF C trp 35 wurde mit Pst I und Xba I abgebaut. Das große Fragment wurde isoliert.
3. Das kleine Xba I-Pst I-Fragment von pLeIF C trp 35 wurde mit Xba I und Sau 96 abgebaut. Ein 40 Basenpaar-Xba I Sau 96-Fragment wurde isoliert.
4. Die in den Stufen 1), 2) und 3) isolierten Fragmente wurden zu dem Expressions-Plasmid pLeIF I trp 1 verknüpft.

10 LeIF-J

- 15 1. Das Plasmid pLeIF J enthält ein 3800-Basen-Hind III-Fragment von Humangenom-DNA, das die LeIF J-Gen-Sequenz aufweist. Ein 760 Basenpaar-Dde I-Rsa I-Fragment wurde aus diesem Plasmid isoliert.
2. Das Plasmid pLeIF B trp 7 wurde mit Hind III und Dde I gespalten und ein 340 bP Hind III - Dde I-Fragment isoliert.
3. Das Plasmid pBR322 wurde mit Pst I gespalten, erhielt durch Inkubation mit DNA Pol I (Klenow-Fragment) ein stumpfes Ende, wurde dann mit Hind III verdaut. Das große (ca. 3600 bp) Fragment wurde isoliert.
4. Die in den Stufen 1), 2) und 3) isolierten Fragmente wurden zu dem Expressions-Plasmid pLeIF J trp 1 verknüpft.

25 Die bei den folgenden Aufbauvorgängen eingesetzten Methoden und Materialien waren wie in der obigen Beschreibung. Die folgende Tabelle 1 liefert die Einzelheiten für den speziellen Zusammenbau von Hybrid-LeIF-Plasmiden:

30 (Es folgt Tabelle 1)

35

40

45

50

55

60

Tabelle 1

LeIF Hybrid	Aminosäuren insgesamt*	Expressions- Plasmid (Vektor)	Vorderteil			Hinterteil	Aminosäuren	anfallendes Expressions-Plasmid
			Fragment	Aminosäuren	Fragment			
AD	165	a	Xba I-Pvu II von pLeIF A trp 25 (285 bp)	1-91	Pvu II-Pst I von pLeIF D trp 11 (~550 bp)	93-166	pLeIF AD trp (Pvu II)	
DA	166	a	Xba I-Pvu II von pLeIF D trp 11 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst I von pLeIF A trp 25 (~550 bp)	92-165	pLeIF DA trp (Pvu II)	
AD	165	-	Bgl II-Pst I großes Fragment v. pLeIF A trp 25	1-62	Bgl II-Pst I von pLeIF D trp 11 (~600 bp)	64-166	pLeIF AD trp (Bgl II)	
DA	166	-	Bgl II-Pst I großes Fragment pLeIF D trp 11	1-63	Bgl II-Pst I von pLeIF A trp 25 (~700 bp)	63-165	pLeIF DA trp (Bgl II)	
AB	165	a	Xba I-Pvu II von LeIF A trp 25 (285 bp)	1-91	Pvu II partial-Pst I von pLeIF B trp 7 (~750 bp)	93-166	pLeIF AB trp (Pvu II)	
AF	165	a	Xba I-Pvu II von LeIF A trp 25 (285 bp)	1-91	Pvu II-Pst I von pLeIF F trp 1 (~700 bp)	93-166	pLeIF AF trp (Pvu II)	
AG	165	a	Xba I-Pvu II von LeIF A trp 25 (285 bp)	1-91	Pvu II-Pst I von pLeIF G (~750 bp)	93-166	pLeIF AG trp (Pvu II)	
AI	165	a	Xba I-Bgl II partial von pLeIF A trp 25 (~455 bp)	1-150	Bgl II-Pst I von LeIF I trp 1 (~650 bp)	151-165	pLeIF AI trp (Bgl II)	

Tabelle 1 (Fortsetzung)

LeIF Hybrid	Aminosäuren insgesamt*	Expressions-Plasmid (Vektor)	Vorderteil Fragment	Aminosäuren	Fragment	Hinterteil	Aminosäuren	anfallendes Expressions-Plasmid
BA	166	b	Hind III-Pvu II von pLeIF B trp 7 (~630 bp)	1-92	Pvu II-Pst I von pLeIF A trp 25 (~550 bp)	92-165	pLeIF BA trp (Pvu II)	
BD	166	b	Hind III-Pvu II von pLeIF B trp 7 (~630 bp)	1-92	Pvu II-Pst I von pLeIF D trp 11 (~550 bp)	93-166	pLeIF BD trp (Pvu II)	
BF	166	b	Hind III-Pvu II v. pLeIF B trp 7 (~630 bp)	1-92	Pvu II-Pst I von pLeIF F trp 1 (~700 bp)	93-166	pLeIF BF trp (Pvu II)	
BG	166	b	Hind III-Pvu II von pLeIF B trp 7 (~630 bp)	1-92	Pvu II-Pst I von pLeIF G (~750 bp)	93-166	pLeIF BG trp (Pvu II)	
DB	166	a	Xba I-Pvu II von pLeIF D trp 11 (288 bp)	1-92	Pvu II partial-Pst I von pLeIF B trp 7 (~750 bp)	93-166	pLeIF DB trp (Pvu II)	
DF	166	a	Xba I-Pvu II von pLeIF D trp 11 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst I von pLeIF F trp 1 (~700 bp)	93-166	pLeIF DF trp (Pvu II)	
DG	166	a	Xba I-Pvu II von pLeIF D trp 11 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst I von pLeIF G (~750 bp)	93-166	pLeIF DG trp (Pvu II)	
FA	166	a	Xba I-PVU II von pLeIF F trp 1 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst I von pLeIF A trp 25 (~550 bp)	92-165	pLeIF FA trp (Pvu II)	

Tabelle 1 (Fortsetzung)

LeIF Hybrid	Aminosäuren insgesamt*	Expressions-Plasmid (Vektor)	Vorderteil Fragment	Aminosäuren	Fragment	Hinterteil	Aminosäuren	anfallendes Expressions-Plasmid
FB	166	a	Xba I-Pvu II von pLeIF F trp 1 (288 bp)	1-92	Pvu II partial-Pst I von pLeIF B trp 7 (~750 bp)	93-166		pLeIF FB trp (Pvu II)
FD	166	a	Xba I-Pvu II von pLeIF F trp 1 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst I von pLeIF D trp 11 (~550 bp)	93-166		pLeIF FD trp (Pvu II)
FG	166	a	Xba I-Pvu II von pLeIF F trp 1 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst I von pLeIF G (~750 bp)	93-166		pLeIF FG trp (Pvu II)
IA	166	a	Xba I-Bgl II von pLeIF I trp 1 (~458 bp)	1-151	Bgl II-Pst I von pLeIF A trp 25 (~430 bp)	152-166		pLeIF IA trp (Bgl II)

* ohne N-endständiges Methionin

a großes (ca. 3900 bp) Fragment von XbaI bis PstI-Verdauung von pLeIF A trp 25.

b großes (ca. 3600 bp) Fragment von Hind III bis PstI-Verdauung von pBR322.

Unter weiterer Bezugnahme auf Tabelle 1 wurden die ersten vier beschriebenen-Hybrid-LeIFs aus zwei LeIF-Expressions-Plasmiden hergestellt. Eine Bgl II-Stelle, wie sie LeIF A und D cDNAs gemein ist, wurde zum Aufbau eines Expressions-Plasmids pLeIF trp AD (Bgl II) verwendet, was die 63 in Aminogruppen endenden Aminosäuren von LeIF A und die 102 als Carboxylgruppen endenden Aminosäuren von LeIF D codiert. Die gleiche Stelle wurde beim Aufbau eines Expressions-Plasmids pLeIF trp DA (Bgl II) verwendet, das 64 in Aminogruppen endende Aminosäuren von LeIF D und 102 in Carboxylgruppen endende Aminosäuren von LeIF A codiert. Die Pvu II-Stelle ist beim Aufbau der beiden anderen Hybrid-Interferon-Expressions-Plasmide verwendet worden: 91 in Aminogruppen endende Aminosäuren von A mit 74 in Carboxylgruppen endenden Aminosäuren von D (pLeIF trp AD (Pvu II)) und 92 in Aminogruppen endende Aminosäuren von LeIF D mit 74 in Carboxylgruppen endenden Aminosäuren von LeIF A (pLeIF trp DA (Pvu II)). Zusammengefaßt:

pLeIF AD trp (PvuII):

Das große (ca. 3900 bp) Fragment eines Xba I- und Pst I-Abbaus von pLeIF A trp 25 wurde mit einem 285 bp Xba I-Pvu II-Fragment von pLeIF A trp 25 und einem ca. 550 bp Pvu II-Pst I-Fragment von pLeIF D trp 11 verknüpft;

pLeIF DA trp (Pvu II):

Das große (ca. 3900 bp) Fragment von einem Xba I- und Pst I-Abbau von pLeIF A trp 25 wurde mit einem 288 bp Xba I-Pvu II-Fragment von pLeIF D trp 11 und einem ca. 550 bp Pvu II-Pst I-Fragment von pLeIF A trp 25 verknüpft;

pLeIF AD trp (Bgl II):

Das große Fragment von einem Bgl II-, Pst I-Abbau von pLeIF A trp 25 wurde mit einem ca. 600 bp Bgl II-Pst I-Fragment von pLeIF D trp 11 verknüpft; und

pLeIF DA trp (Bgl II):

Das große Fragment von einem Bgl II-, und Pst I-Abbau von pLeIF D trp 11 wurde mit einem ca. 700 bp-Fragment, erhalten durch Pst I-Spaltung von pLeIF A trp 25 und nachfolgende Bgl II-Verdauung, verknüpft.

30 Beim 5. angegebenen Hybrid:

pLeIF AB trp (Pvu II):

Das große (ca. 3900 bp) Fragment von einem Xba I und Pst I-Abbau von pLeIF A trp 25 wurde mit einem 285 bp Xba I-Pvu II-Fragment von pLeIF A trp 25 und einem ca. 750 bp Pvu II-(partial)-Pst I-Fragment von pLeIF B trp 7 verknüpft.

Ähnlich sind die anderen in Tabelle 1 wiedergegebenen Zusammensetzungen festgelegt. Als weiteres Beispiel kann man beim Aufbau eines LeIF C und/oder LeIF H-Teil enthaltenden Hybrids Vorteil ziehen aus gemeinsamen Bbv I-Stellen, die etwa beim Nucleotid 294 (d. h. GCTGC) der Gen-Sequenzen auftreten.

Ähnlich können Plasmide, die sich zur mikrobiellen Expression anderer neuer Hybrid-Leukozyten-Interferone eignen, durch geeignete Manipulation der alle oder Teile der Aminosäuresequenzen natürlich auftretender Leukozyten-Interferone codierenden Doppelstrang-DNA gebildet werden. So wird ein erstes Doppelstrang-DNA-Fragment gewählt, das das Aminoende einer ersten, natürlich vorkommenden Leukozyten-Interferon-Aminosäuresequenz und, in 3'-Richtung fortschreitend, einen erheblichen Teil der Aminosäuresequenz codiert. Das Fragment weist eine Restriktions-Endonuclease-Spaltsstelle nahe den Codons für die Aminosäure "n" des ersten Leukozyten-Interferons auf, wobei n Aminosäuren einen erheblichen Teil der Aminosäuresequenz des ersten Interferons bilden. Die Spaltung mit der Restriktions-Endonuclease liefert ein Fragment mit dem Aminoende des ersten Interferons und Codons für etwa n Aminosäuren. Ein zweites Fragment mit allen oder einem Teil der Codons für die Aminosäure-Sequenz eines zweiten, anderen Leukozyten-Interferons wird gewählt, wobei das Fragment eine Spaltsstelle für eine identische Restriktions-Endonuclease nahe Codons für jene Aminosäure des zweiten Interferons aufweist, deren Aminosäurezahl (vom Aminoende des zweiten Interferons fortschreitend) etwa 166-n ist. Die Spaltung des zweiten Fragments mit der Restriktions-Endonuclease liefert ein Produkt komplementär zu dem "n"-Endteil des Verdauungsprodukts des ersten Fragments, so daß das Verdauungsprodukt des zweiten mit dem des ersten verknüpft werden kann, unter Rückbildung der Restriktions-Endonuclease-Erkennungsstelle und erneuter Bildung des Codons für die Aminosäure n des ersten Interferons, sofern bei der ersten Verdauung verlorengegangen. Das Produkt der Restriktions-Endonuclease-Verdauung des zweiten Fragments läuft vorzugsweise von dem Ende aus ab, das bei der Spaltung in 3'-Stellung durch Nucleotide anfällt, die das Carboxylende des zweiten Leukozyten-Interferons codieren.

Andererseits können Hybride, die erhebliche Teile der Aminosäure-Sequenzen von mehr als zwei natürlich vorkommenden Leukozyten-Interferonen enthalten, gebildet werden, wobei dann z. B. das oben erwähnte zweite Fragment außerdem dazu ausgewählt wird, eine zweite Restriktions-Endonuclease-Stelle hinter der ersten zu

enthalten, wobei die zweite Stelle identisch einer ähnlich gelagerten Stelle innerhalb eines Fragments ist, das das Carboxyl-Endteil eines dritten Leukozyten-Interferons codiert usw. In dem genannten Beispiel können die Produkte der aufeinanderfolgenden Restriktions-Endonuclease-Einsätze dreifach verknüpft werden, um ein Hybridgen zu bilden, das den Amino-Endgruppenteil eines ersten Interferons, den Mittelbereich der Aminosäuresequenz des zweiten und den Carboxyl-Endteil des dritten codiert (oder einer weiteren Variante des ersten, wobei das erste und das dritte Interferon gleich sind).

Vorzugsweise leitet sich das erste oben erwähnte Fragment von einem Expressions-Plasmid ab, d. h. einem solchen, bei dem Codons für den Amino-Endteil des ersten Leukozyten-Interferons als Vorgänger ein ATG- oder anderes Translations-Initiations-Codon und einen Promoter oder Promoter-Operator-System haben. Im Ergebnis wird das Endprodukt der oben beschriebenen Manipulationen ein Plasmid sein, das das vom Hybridgen in Bakterien oder anderen mikrobiellen, mit den Plasmid transformierten Organismen codierte Polypeptid zu exprimieren vermag. Weitere Maßnahmen zur Gestaltung des Hybridgens für mikrobielle Expression liegen für den Fachmann auf der Hand.

Bei bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung codieren die Hybridgene eine neue Leukozyten-Interferon-Aminosäure-Sequenz von etwa 165 bis 166 Aminosäuren, ein Konjugat wesentlicher Aminosäure-Sequenzen von zwei oder mehr verschiedenen Leukozyten-Interferonen darstellend, ausgewählt unter LeIF A, LeIF B, LeIF C, LeIF D, LeIF E, LeIF F, LeIF G und LeIF H, wie in Fig. 3a und 3b dargestellt. Am meisten bevorzugt weisen die neuen, von den Hybridgenen codierten Leukozyten-Interferone die genannten und wie in der Sequenz "alle" der Fig. 3a und 3b angegeben angeordneten Aminosäuren auf. Die Expressionsprodukte von Plasmiden, erfindungsgemäß hergestellt, können in herkömmlicher Weise auf antivirale Aktivität getestet werden, wie in den nachfolgend beschriebenen biologischen Aktivitätsbestimmungen.

Nachweis der antiviralen Aktivität

E. coli K-12 Stamm 294 wurden in herkömmlicher Weise unabhängig mit den Plasmiden pLeIF trp A 25, pLeIF trp D, pLeIF trp A/D (Bgl II) und pLeIF trp D/A (Bgl II) transformiert. Die Transformanten wurden getrennt in 5 ml-Kulturen in L-Brühe mit 5 mg/ml Tetracyclin zu einem A_{550} -Wert von 1,0 gezüchtet, dann in 1 l M9-Medium mit 5 μ g/ml Tetracyclin verdünnt. Die Zellen wurden geerntet, wenn A_{550} 1,0 erreichte, und die Zellen in 10 ml 15%iger Saccharose, 50 mmol. Tris-HCl (pH 8,0), 50 mmol. EDTA suspendiert. 10 mg Lysozym wurden zugesetzt, und nach 5 min bei 0 °C wurden die Zellen durch Schalleinwirkung aufgebrochen. Die Proben wurden 10 min bei 15.000 UpM in einem Sorvall SM-24-Rotor zentrifugiert. Die Interferon-Aktivität der überstehenden Flüssigkeiten wurde auf antivirale Aktivität getestet.

Die Ausbeuten pro 1 Kultur dieser Interferone, an einem menschlichen Zellstamm (Wish) titriert, sind in Tabelle 2 gezeigt, aus der klar wird, daß die LeIF-A/D-Aktivität in größerem Maße hervorgerufen wird als die anderer Interferone. Dieser Unterschied könnte auf der größeren vorgegebenen Aktivität des LeIF-A/D- oder auf größerer Ausbeute, ausgedrückt in mg Protein dieses Interferons, beruhen. Da die genetische Verbindung für alle diese Interferone identisch war, erscheint es am wahrscheinlichsten, daß LeIF-A/D praktisch eine größere Aktivität als die anderen Interferone besitzt.

40

Tabelle 2Ausbeute an Leukozyten-Interferonen aus Schüttelkolbenkulturen von *E. coli*

45

Art des Interferons

Aktivität, Ausbeute/l
(Einheiten an Wish) +)

50

A

 8×10^7

D

 5×10^6

AD (Bgl II)

 2×10^8

DA (Bgl II)

 1×10^6

55

+) getestet durch Hemmung des cytopathischen Effekts an Wish-Zellen mit VSV als Testsubstanz

Die Wirksamkeit der verschiedenen Interferone in einer Reihe von Säugetier-Zellstämmen wurde bestimmt (vom Menschen Wish; von der afrikanischen grünen Meerkatze Vero; Hamster-Fibroblast BHK; Nierenzellen vom Kaninchen, RK-13; Maus L-929; und Rinderniere, MDBK-Zellen). Um die relative Aktivität der Interferone zu vergleichen, wurde ihre Aktivität an verschiedenen Zellen, relativ zu ihrer Aktivität an Wish-Zellen als 100 angesetzt, berechnet. Die Ergebnisse in Tabelle 3 zeigen, daß LeIF-A/D eine sehr hohe Aktivität in VERO und L-929-Zellen hat, während LeIF-D/A eine geringe Aktivität in diesen Zellstämmen hat. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Kombination des N-Endteils von LeIF-A und des C-Endteils von LeIF-D innerhalb eines Moleküls (LeIF-A/D) zu der besonderen Wirksamkeit des Hybrid-Proteins beiträgt, die in verschiedenen Säugetierarten ihren Ausdruck findet. Weiter sind diese Eigenschaften nicht eine einfache Summierung der Eigenschaften der Ausgangs-Interferone. Dies zeigt sich deutlich im Fall der Aktivität an L-929-Zellen (Tabelle 3), in welchem Falle weder ein Gemisch aus LeIF-A und LeIF-D noch das andere Hybrid, LeIF-D/A, eine erhebliche Aktivität aufweist.

Tabelle 3

Titration verschiedener Leukozyten-Interferone in Zellstämmen aus verschiedenen Säugetierarten

Zellstamm	Leukozyten-Interferone ⁺⁾					Leukozytenfilm in zentrifugiertem Blut
	A	D	A/D	D/A	A+D	
WISH	100	100	100	100	100	100
VERO	250	75	1.670	20	200	200
BHK	400	200	833	2.000	400	20
RK-13	12	500	6	N.D.	N.D.	120
L-929	150	5	3.300	2	10	0,1

Anmerkung zu Tabelle 3:

- +) Interferone, getestet gegen VSV-Infektion der verschiedenen Zellstämme. Aktivitäten ausgedrückt als Prozentsatz der in WISH-Zellen beobachteten Aktivität.

Die Aktivität von LeIF-A/D gegen andere Viren wurde auch untersucht. Die Daten in Fig. 5 zeigen antivirale Effekte gegenüber EMC-Virusinfektion von L-Zellen, und die Daten in Fig. 6 zeigen Effekte gegenüber VSV-Infektion von L-Zellen. Aus diesen Daten wird klar, daß die größere Aktivität von LeIF-A/D nicht auf ein Virus (VSV) beschränkt ist und die größere Aktivität offenbar eine allgemeine Eigenschaft gegenüber vielen Viren ist. Natürliche Human-Leukozytenfilm-Interferon-Präparate haben keine Wirkung gegenüber Mauszellen (siehe Tabelle 2). Die Aktivität von LeIF-A/D gegen EMC-Virusinfektion von CD-1-Mäusen wurde daher untersucht. Die Ergebnisse in Fig. 7 zeigen, daß LeIF-A/D extrem wirksam ist gegenüber letaler EMC-Virusinfektion und LeIF-A auch antivirale Aktivität hat, wie von der Aktivität in Zellstämmen (Tabelle 2) zu erwarten ist. Die Daten in Fig. 7 stammen aus Behandlungen i. p. 3 h vor der Infektion. Die Dosen an LeIF-A/D und LeIF-A sind wie an WISH titriert.

Letale EMC-Virusinfektion von Hamstern wird auch durch LeIF-A/D und LeIF-A (Fig. 8) beeinträchtigt, wobei ersteres das wirksamste ist, und Leukozytenfilm-Interferon zeigt nur einen kleinen und statistisch insignifikanten Effekt. Im Falle von Fig. 8 wurden alle Interferone i. p. 3 h vor der Infektion in einer Dosis von $5 \times 10^5 \mu\text{g/kg}$, titriert an WISH-Zellen, gegeben.

Diese Ergebnisse zeigen an, daß die ausgeprägten antiviralen Effekte von LeIF-A/D bei einer Reihe von Säugetierarten nicht auf Zellkulturen beschränkt sind, sondern auch bei letalen Virusinfektionen beobachtet werden.

EMC-Virus kann als Modellsystem angesehen werden, wobei eine Demonstration der antiviralen Wirkung gegen dieses System eine Voraussage der antiviralen Wirkung gegen die verkörperte Virusfamilie ermöglichen mag, z. B. die Picornavirus-Familie, für die Maul- und Klauenseuche und Polio Vertreter sind. VSV-Virus kann als Modellsystem betrachtet werden, und eine Demonstration der antiviralen Wirkung gegen dieses mag eine Voraussage zur antiviralen Wirkung gegen die verkörperte Virusfamilie gestatten, z. B. die Rhabdovirus-Familie, deren wichtiger Vertreter Rabies ist.

Tabelle 4 enthält eine Zusammenstellung der Aktivitäten verschiedener LeIF-Hybride an WISH- und MDBK-Zellen und deren Aktivitätsverhältnisse:

Tabelle 4

5	LeIF Hybrid (PvuII)	Einheiten/l Kultur WISH-Zellen	Einheiten/l Kultur MDBK-Zellen	Aktivitätsverhältnis WISH/MDB
10	AB	2.4×10^8	4×10^7	6
	AD	1.2×10^8	2×10^7	6
	AF	6×10^7	1×10^7	6
	AG	4×10^7	1.5×10^7	2.7
	AI	3.2×10^7	1.2×10^7	2.7
	BA	1.5×10^7	1×10^7	1.5
15	BD	6×10^7	1.5×10^7	4
	BF	1×10^6	3.5×10^5	0.3
	BG	2×10^7	6×10^7	0.3
	DA	3×10^6	1.2×10^8	0.025
	DB	2×10^6	5×10^7	0.04
	DF	2×10^5	4×10^6	0.05
20	DG	2×10^5	1.5×10^7	0.014
	FA	2×10^5	6×10^7	0.003
	FB	2×10^6	8×10^7	0.025
	FD	1×10^7	2×10^7	0.5
	FG	1×10^6	4×10^7	0.025
	IA	2.4×10^6	6×10^7	0.04
25	A*	8×10^7	1.2×10^8	0.7
	B*	8×10^7	4×10^8	0.2
	C*	2×10^7	1.5×10^7	1.3
	D*	5×10^6	2.5×10^7	0.2
	F*	2×10^7	2×10^8	0.1
	I*	1.6×10^7	1.2×10^7	1.3
35	* Zu Vergleichszwecken			

Parenterale Verabreichung

Die Hybrid-Leukozyten-Interferone können Personen, die Antitumor- oder antivirale Behandlung benötigen, und solchen, die immunsuppressive Bedingungen zeigen, parenteral verabreicht werden. Dosierung und Dosisrate können denen gleichen, die derzeit bei klinischen Untersuchungen von aus Menschen stammenden Materialien angewandt werden, z. B. etwa $(1 \text{ bis } 10) \times 10^6$ Einheiten täglich, und im Falle von Materialien größerer Reinheit als 1 %, ohne weiteres bis zu beispielsweise 5×10^7 Einheiten täglich. Vorläufige Hinweise bei der oben beschriebenen Affenuntersuchung lassen vermuten, daß Dosierungen von bakteriell erhaltenem Le-IF zwecks größerer Wirkung erheblich erhöht werden könnten, dank dem praktischen Fehlen von anderen menschlichen Proteinen als Le-IF, die in aus Leukozyten stammenden Materialien als Fieber erzeugende Stoffe wirken können und dabei nachteilige Effekte, z. B. Unwohlsein, Temperaturerhöhung, usw. zeigen.

Als ein Beispiel für eine geeignete Dosierungsform für im wesentlichen homogenes bakterielles Le-IF in parenteraler Form, hier mit den nötigen Änderungen anzuwenden, können 3 mg Le-IF der spezifischen Aktivität von z. B. 2×10^8 E/mg in 25 ml 5 n Serumalbumin (human) - USP gelöst werden, die Lösung durch ein bakteriologisches Filter geführt und die filtrierte Lösung aseptisch in 100 Ampullen unterteilt werden, von denen diese 6×10^6 Einheiten reines Interferon, für parenterale Verabreichung geeignet, enthält. Die Ampullen werden vor ihrer Verwendung vorzugsweise in der Kälte (-20 °C) gelagert.

Die erfundungsgemäßen Verbindungen können nach bekannten Methoden zur Herstellung pharmazeutisch

brauchbarer Mittel zusammengestellt werden, wodurch das Polypeptid mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger zusammengemischt wird. Geeignete Träger und deren Zusammenstellung sind in Remington's Pharmaceutical Sciences von E. W. Martin beschrieben, dessen Offenbarung durch diese Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung aufgenommen wird. Solche Mittel enthalten eine wirksame Menge des Interferon-Proteins zusammen mit einer geeigneten Menge eines Trägers zur Herstellung pharmazeutisch annehmbarer Mittel, die sich zur wirksamen Verabreichung eignen.

10

PATENTANSPRÜCHE

15

1. Verfahren zur Herstellung neuer Mikroorganismen, die zur Produktion von Polypeptiden mit der Aminosäure-Sequenz von hybriden Human-Leukozyten-Interferonen fähig sind, **dadurch gekennzeichnet**, daß man einen Mikroorganismus mit einem replikablen Expressionsvektor, der eine für hybrides Human-Leukozyten-Interferon kodierende DNA-Sequenz enthält, in an sich bekannter Weise transformiert und kultiviert.

20

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Transformation mit einem Plasmid durchgeführt wird.

25

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Transformation mit einem Expressionsvektor durchgeführt wird, der eine doppelsträngige DNA-Sequenz zur Expression bringen kann, die besteht aus einem ersten doppelsträngigen DNA-Fragment, das den N-terminalen Bereich von Human-Leukozyten-Interferon D kodiert, und aus einem zweiten doppelsträngigen DNA Fragment, das den C-terminalen Bereich von Human-Leukozyten-Interferon A kodiert und die beide über eine Pvull-Schnittstelle miteinander verbunden sind.

30

4. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Transformation mit einem Expressionsvektor durchgeführt wird, der eine doppelsträngige DNA-Sequenz zur Expression bringen kann, die besteht aus einem ersten doppelsträngigen DNA-Fragment, das den N-terminalen Bereich von Human-Leukozyten-Interferon A kodiert, und aus einem zweiten doppelsträngigen DNA Fragment, das den C-terminalen Bereich von Human-Leukozyten-Interferon D kodiert und die beide über eine Pvull-Schnittstelle miteinander verbunden sind.

35

5. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Transformation mit einem Expressionsvektor durchgeführt wird, der eine doppelsträngige DNA-Sequenz zur Expression bringen kann, die besteht aus einem ersten doppelsträngigen DNA-Fragment, das den N-terminalen Bereich von Human-Leukozyten-Interferon D kodiert, und aus einem zweiten doppelsträngigen DNA Fragment, das den C-terminalen Bereich von Human-Leukozyten-Interferon A kodiert und die beide über eine BglII-Schnittstelle miteinander verbunden sind.

45

6. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Transformation mit einem Expressionsvektor durchgeführt wird, der eine doppelsträngige DNA-Sequenz zur Expression bringen kann, die besteht aus einem ersten doppelsträngigen DNA-Fragment, das den N-terminalen Bereich von Human-Leukozyten-Interferon A kodiert, und aus einem zweiten doppelsträngigen DNA Fragment, das den C-terminalen Bereich von Human-Leukozyten-Interferon D kodiert und die beide über eine BglII-Schnittstelle miteinander verbunden sind.

50

7. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Transformation mit einem Expressionsvektor durchgeführt wird, der eine doppelsträngige DNA-Sequenz zur Expression bringen kann, die besteht aus einem ersten doppelsträngigen DNA-Fragment, das den N-terminalen Bereich von Human-Leukozyten-Interferon A kodiert, und aus einem zweiten doppelsträngigen DNA Fragment, das den C-terminalen Bereich von Human-Leukozyten-Interferon B kodiert und die beide über eine Pvull-Schnittstelle miteinander verbunden sind.

60

8. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Transformation mit einem Expressionsvektor durchgeführt wird, der eine doppelsträngige DNA-Sequenz zur Expression bringen kann, die besteht aus einem ersten doppelsträngigen DNA-Fragment, das den N-terminalen Bereich von Human-Leukozyten-Interferon A kodiert, und aus einem zweiten doppelsträngigen DNA Fragment, das den C-terminalen

Bereich von Human-Leukozyten-Interferon F kodiert und die beide über eine PvuII-Schnittstelle miteinander verbunden sind.

- 5 9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Ausgangsmikroorganismus ein Bakterium eingesetzt wird.
10. Verfahren gemäß Anspruch 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Bakterium ein Stamm von E. coli eingesetzt wird.
- 10 11. Verfahren gemäß Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß als Bakterium E. coli K-12 Stamm 294 eingesetzt wird.

15

Hiezu 13 Blatt Zeichnungen

20

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Patentschrift Nr. AT 394 209 B

Ausgegeben

25.2.1992

Blatt 1

Int. Cl.⁵: C12N 15/21
C12N 1/21
C12P 21/02
// (C12N 1/21
C12R 1 : 19)

Fig. 1a

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Patentschrift Nr. AT 394 209 B

Ausgegeben

25.2.1992

Blatt 2

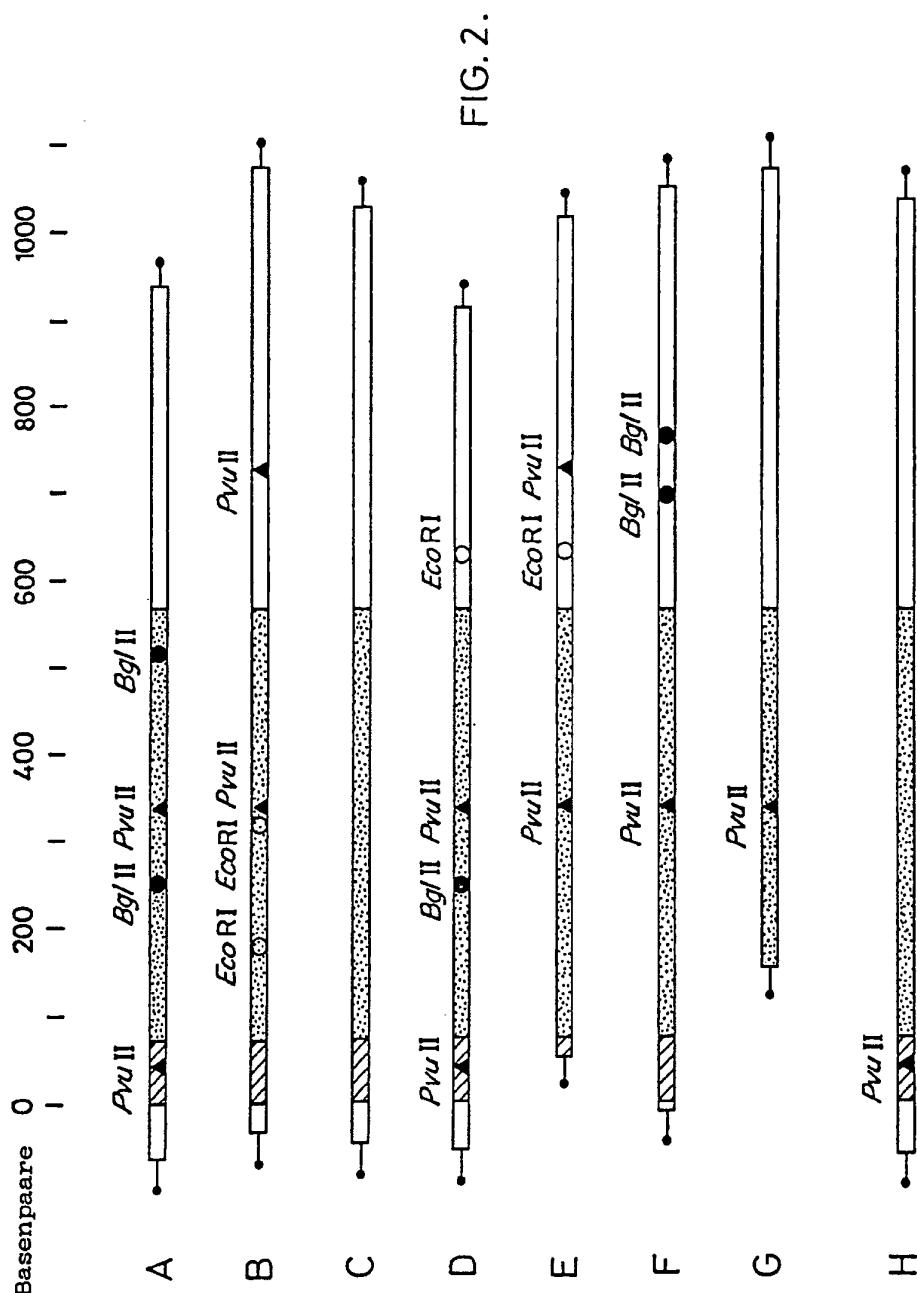
Int. Cl.⁵: C12N 15/21
C12N 1/21
C12P 21/02
// (C12N 1/2
C12R 1 : 19)

Fig. 1b

Ausgegeben

25. 2.1992

Blatt 3

Int. Cl. 5: C12N 15/21
C12N 1/21
C12P 21/02
// (C12N 1/21
C12R 1 : 19)

Ausgegeben

25. 2.1992

Blatt 4

Int. Cl.⁵: C12N 15/21
 C12N 1/21
 C12P 21/02
 // (C12N 1/21
 C12R 1 : 19)

	S1	S10	S20	S23
LeIF A	M A L T F A L L V A L L V L S C K S S C S V G C D L P Q T			
LeIF B	M A L T F Y L M V A L V V L S Y K S F S S L G C D L P Q T			
LeIF C	M A L S F S L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T			
LeIF D	M A S P F A L L M V L V V L S C K S S C S L G C D L P E T.			
LeIF E	M A S P F A L L M V L V V L S C K S S C S L G C D L P Q A			
LeIF F	M A L S F S L L M A V L V L S Y K S I C S L G C D L P Q T			
LeIF G	M A L P F S L M M A L V V L S C K S S C S L G C N L S Q T			
Alle	<u>M</u> A F <u>L</u>	V L S K S <u>S</u> G C <u>L</u> T		
		50	60	
LeIF A	E E F ~ G N Q F Q K A E T I P V L H E M I Q Q I F N L F S			
LeIF B	E E F D D K Q F Q K A Q A I S V L H E M I Q Q T F N L F S			
LeIF C	E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E M I Q Q T F N L F S			
LeIF D	E E F D G N Q F Q K A P A I S V L H E L I Q Q I F N L F T			
LeIF E	Q V F H G N H F Q K V Q A I F L F H E M M Q Q T F N L F S			
LeIF F	E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E M I Q Q T F N L F S			
LeIF G	E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E M I Q Q T F N L F S			
LeIF H	E E F D G N Q F Q K A Q A I S V L H E M M Q Q T F N L F S			
Alle	<u>E</u> E F D <u>Q</u> F <u>Q</u> K A I V L H <u>E</u> <u>Q</u> Q F N L <u>E</u>			
		110	120	130
LeIF A	V G V T E T P L M K E D S I L A V R K Y F Q R I T L Y L K			
LeIF B	V G V I E S P L M Y E D S I L A V R K Y F Q R I T L Y L T			
LeIF C	V G V E E T P L M N E D S I L A V R K Y F Q R I T L Y L I			
LeIF D	E R V G E T P L M N V D S I L A V K K Y F R R I T L Y L T			
LeIF E	V G V E E T P L R N V D S I L A V R K Y F Q R I T L Y L T			
LeIF F	V G V E E T P L M N V D S I L A V K K Y F Q R I T L Y L T			
LeIF G	V G V E D T P L M N V D S I L T V R K Y F Q R I T L Y L T			
LeIF H	V G V E E T P L M N E D S I L A V R K Y F Q R I T L Y L M			
Alle	V P L M D S I L V K Y F R I T L Y L			

FIG. 3. (a)

Ausgegeben

25. 2.1992

Blatt 5

Int. Cl. 5: C12N 15/21

C12N 1/21

C12P 21/02

//(C12N 1/21

C12R 1 : 19)

10	20	30	40
H S L G S R R T L M L L A Q M R K I S L F S C L K D R H D F G F P Q			
H S L G N R R A L I L L A Q M R R I S P F S C L K D R H D F E F P Q			
H S L G N R R A L I L L G Q M G R I S P F S C L K D R H D F R I P Q			
H S L D N R R T L M L L A Q M S R I S P S S C L M D R H D F G F P Q			
H S V G N R R A F I L L T Q M R R I S P F S Y L K D R H D F D F P H			
H S L G N R R A L I L L A Q M G R I S P F S C L K D R H D F G F P Q			
H S L N N R R T L M L M A Q M R R I S P F S C L K D R H D F E F P Q			
H S L R R L L Q M I S S C L D R H D F P Q			
70 80 90 100			
T K D S S A A W D E T L L D K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C V I Q G			
T K D S S A A L D E T L L D E F Y I E L D Q Q L N D L E V L C D Q E			
T E D S S A A W E Q S L L E K F S T E L Y Q Q L N D L E A C V I Q E			
T K D S S A A W D E D L L D K F C T E L Y Q Q L N D L E A C V M Q E			
T K D S S D T W D E T L L D K S Y T E L Y Q Q L N D L E A C V M * K			
T K D S S A T W E Q S L L E K F S T E L N Q Q L N D M E A C V I Q E			
T K D S S A T W D E T L L D K F Y T E L Y Q Q L N D L E A C M M Q E			
T K N S S A A W D E T L L E K F Y I E L F Q Q M N D L E A C V I Q E			
T S S A L L F E L Q Q N D E . Q			
140 150 160 166			
E K K Y S P C A W E V V R A E I M R S F S L S T N L Q E S L R S K E			
E K K Y S S C A W E V V R A E I M R S F S L S I N L Q K R L K S K E			
E R K Y S P C A W E V V R A E I M R S L S F S T N L Q K R L R R K D			
E K K Y S P C A W E V V R A E I M R S L S L S T N L Q E R L R R K E			
E K K Y S P C S W E A V R A E I M R S F S L * T N L Q E R L R R K E			
E K K Y S P C A W E V V R A E I M R S F S L S K I F Q E R L R R K E			
E K K Y S P C A W E V V R A E I M R S F S L S A N L Q E R L R R K E			
E K K Y S P C A W E V V R A E I M R S F S F S T N L Q K R L R R K D			
E K Y S C A W E V V R A E I M R S S S Q L K			

FIG. 3. (b)

Ausgegeben

25.2.1992

Blatt 6

Int. Cl.⁵: C12N 15/21
C12N 1/21
C12P 21/02
// (C12N 1/21
C12R 1 : 19)

	1		10	
LeIF A	CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY SER ARG ARG THR LEU MET LEU			
LeIF D		GLU		ASP ASN
		40		50
LeIF A	ASP PHE GLY PHE PRO GLN GLU GLU PHE ---- GLY ASN GLN PHE GLN LYS ALA			
LeIF D			ASP	
		70		80
LeIF A	SER THR LYS ASP SER SER ALA ALA TRP ASP GLU THR LEU LEU ASP LYS PHE			
LeIF D	THR			ASP
		110		
LeIF A	GLY VAL GLY VAL THR GLU THR PRO LEU MET LYS GLU ASP SER ILE LEU ALA			
LeIF D	GLU GLU ARG	GLY		ASN VAL
		140		150
LeIF A	SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG SER PHE SER			
LeIF D				LEU

FIG. 4.(a)

ÖSTERREICHISCHES PATENTAMT

Patentschrift Nr. AT 394 209 B

Ausgegeben 25. 2.1992

Int. Cl.⁵: C12N 15/21
C12N 1/21
C12P 21/02
// (C12N 1/21
C12R 1 : 19)

Blatt 7

60 **BgII**
 GLU THR ILE PRO VAL LEU HIS GLU MET ILE GLN GLN | ILE PHE ASN LEU PHE
 PRO ALA SER LEU

90	PvuII	100
TYR THR GLU LEU TYR GLN GLN	LEU ASN ASP	LEU GLU ALA CYS VAL ILE GLN
CYS		MET

120 130
VAL ARG LYS TYR PHE GLN ARG ILE THR LEU TYR LEU LYS GLU LYS LYS TYR
LYS ARG THR

FIG. 4.(b)

Ausgegeben

25. 2.1992

Blatt 8

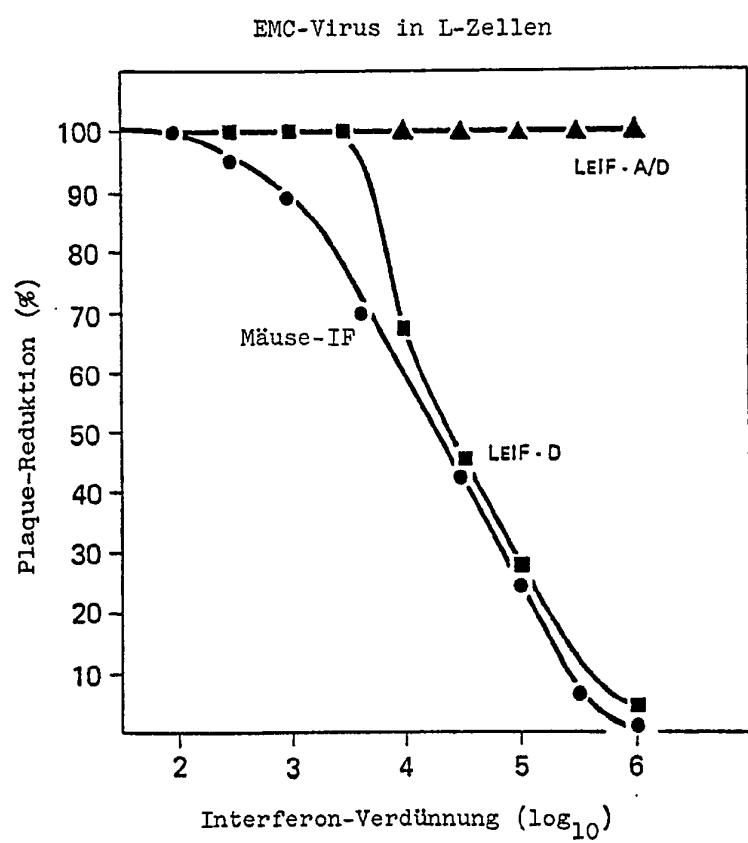
Int. Cl.⁵: C12N 15/21
C12N 1/21
C12P 21/02
//(C12N 1/21
C12R 1 : 19)

FIG. 5.

Ausgegeben

25. 2.1992

Blatt 9

Int. Cl.⁵: C12N 15/21
C12N 1/21
C12P 21/02
//(C12N 1/21
C12R 1 : 19)

Titration verschiedener Interferone
gegen VS-Virus in L-929-Zellen

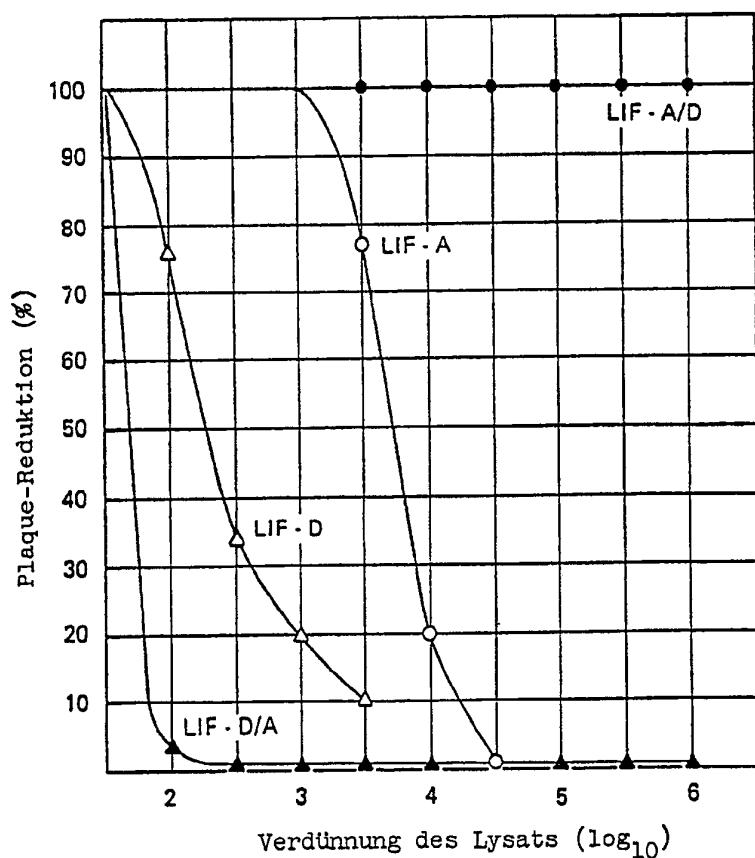


FIG. 6.

Ausgegeben

25.2.1992

Blatt 10

Int. Cl.⁵: C12N 15/21
C12N 1/21
C12P 21/02
//(C12N 1/21
C12R 1 : 19)

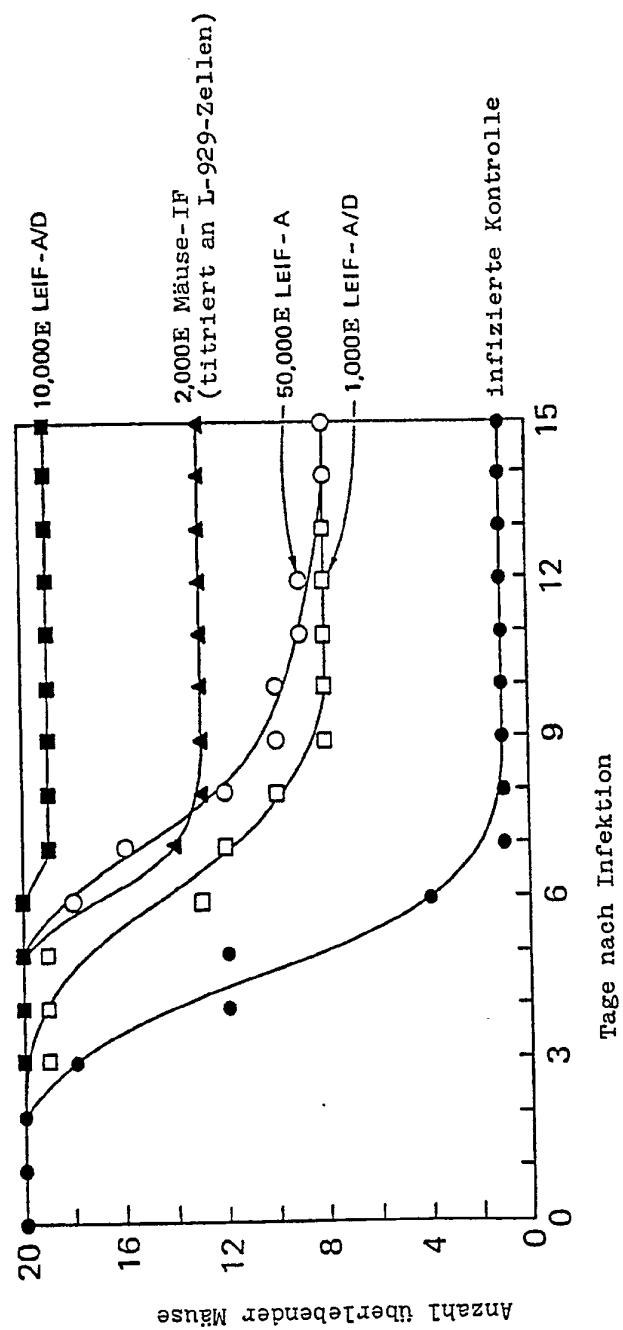


FIG. 7.

Ausgegeben

25. 2.1992

Blatt 11

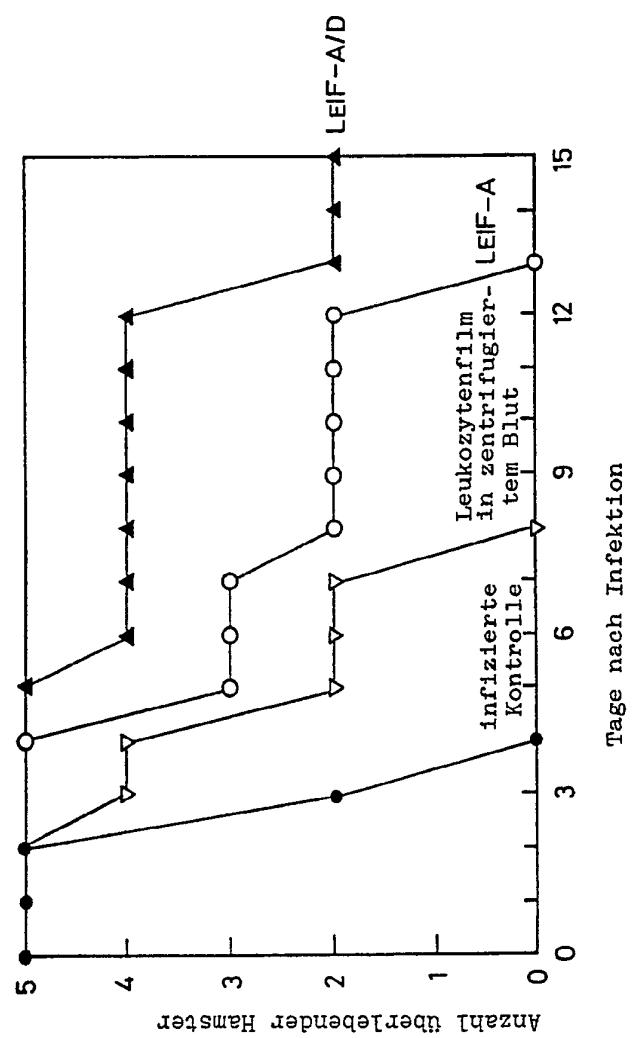
Int. Cl.⁵: C12N 15/21
C12N 1/21
C12P 21/02
// (C12N 1/21
C12R 1 : 19)

FIG. 8.

Ausgegeben

25.2.1992

Blatt 12

Int. Cl.⁵: C12N 15/21
C12N 1/21
C12P 21/02
// (C12N 1/21
C12R 1 : 19)

FIG. 9. (a)

Ausgegeben

25. 2.1992

Blatt 13

Int. Cl.⁵: C12N 15/21

C12N 1/21

C12P 21/02

// (C12N 1/21

C12R 1 : 19)

A H I J C
 TGATGAGGAGCTCCATTCTGGCTGAGGAATACTCTCAAGAATCACTCTGTACTGAAAGAGAAATACGCCCTTGTCCTGGAGGTGT
 TGATGAGGAGCTCCATTCTGGCTGAGGAATACAGGAAATCAGGAAATACGCCCTTGTCCTGGAGGTGT
 TGATGAGGAGCTCCATTCTGGCTGAGGAATACAGGAAATACGCCCTTGTCCTGGAGGTGT
 TGATGAGGAGCTCCATTCTGGCTGAGGAATACAGGAAATACGCCCTTGTCCTGGAGGTGT

 A H I J C
 CAGAGGAAATCATGAGATCTTCTTCTGCAACAACCTGCAAGAAAGTTAGAGATGAAACTGGTCAACATGGAAATGATTTCAT
 CAGAGGAAATCATGAGATCTTCTTCTGCAACAACCTGCAAGAAAGTTAGGGAGGATGAAACTGGTCAACATGGAAATGATTTCAT
 CAGAGGAAATCATGAGATCTTCTTCTGCAACAACCTGCAAGAAAGTTAGGGAGGATGAAACTGGTCAACATGGAAATGATTTCAT
 CAGAGGAAATCATGAGATCTTCTTCTGCAACAACCTGCAAGAAAGTTAGGGAGGATGAAACTGGTCAACATGGAAATGATTTCAT

 A H I J C
 TGATCTGATGCCAGCTCACCTTTATGATCTGCCATTCAAGACTCTGACCTGAGGACCATGCTGACTGATGCCATTCAAGCTTAA
 TGACATTAATCATCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGAT
 TGACATTAATCATCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGAT
 TGACATTAATCATCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGATGAGCTCACCTCTGAT

 A H I J C
 GAGTATTAATCAACTTGTGCTTAAGGCCACTAGTCCCTTAAGGCCACTAGTCCCTTAAGGCCACTAGTCCCTTAAGGCCACTAGTCC
 AGGAGTAAAGAGCACTTACCTCTGAGGACTCTGAGGACTCTGAGGACTCTGAGGACTCTGAGGACTCTGAGGACTCTGAGGACTCT
 AGTGAAGAGCTGCTGATGAGCTGCTGATGAGCTGCTGATGAGCTGCTGATGAGCTGCTGATGAGCTGCTGATGAGCTGCTGAT
 AGTGAAGAGCTGCTGATGAGCTGCTGATGAGCTGCTGATGAGCTGCTGATGAGCTGCTGATGAGCTGCTGATGAGCTGCTGAT

 A H I J C
 TTTATTAACCTTAAACAACTTATTCTGCTTACCTGCTTACCTGCTTACCTGCTTACCTGCTTACCTGCTTACCTGCTTACCTGCTT
 ATTAACTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATT
 TATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATT
 TAACCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATT
 ATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATTCTTATT

 A H I J C
 TAATTTTAACTTGTGCTGACTTGTGAACTTGTGACTTGTGACTTGTGAACTTGTGAACTTGTGAACTTGTGAACTTGTGAACTTGTGAA
 TATATTAATTCCTT
 ATTCTT
 TAATTCCTT
 TAATTCCTT

FIG. 9. (b)