

FEDERÁLNÍ ÚŘAD
PRO VYNÁLEZY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

273 181

(11)

(13) B2

(51) Int. Cl.⁵
C 07 K 15/26

(21) PV 3626-87.0
(22) Přihlášeno 30 06 81
(23) Právo přednosti 01 07 80 (164 986)
08 09 80 (184 909)
10 11 80 (205 578)
21 04 81 US (256 204)

(40) Zveřejněno 12 07 90
(45) Vydáno 03 01 92

(72) Autor vynálezu
GOEDEL DAVID VAN NORMAN, BURLINGAME, CALIFORNIA
PESTKA SIDNEY, NORTH CALDWELL, NEW JERSEY, (US)

(73) Majitel patentu
F. HOFFMANN-LA ROCHE AG, BASEL (CH)
GENENTECH, INC.,
SOUTH SAN FRANCISCO, CALIFORNIA (US)

(54) Způsob výroby E.coli buněk schopných
produkovat zralý lidský leukocytární
interferon

(57) Způsob výroby E.coli buněk schopných
produkovat zralý lidský leukocytární in-
terferon s částečnou aminokyselinovou sek-
vencí Cys-Ala-Trp-Glu-Val-Val-Arg-Ala-Glu-
-Ile-Met-Arg-Ser se 165 až 166 aminokyse-
linami a s aminokyselinou Asp, Glu nebo
Val v poloze 114 nebo, jestliže je na
N-konec první aminokyseliny shora uvedeného
interferonu připojen methionin, se 166
až 167 aminokyselinami a s aminokyselinou
Asp, Glu nebo Val v poloze 115, spočívá
podle vynálezu v tom, že

- a) inkubují se E.coli buňky ošetřené chlo-
ridem vápenatým DNA expresním vektorem
vybraným ze skupiny zahrnující plasmid
pLeIF A trp 25 DNA, plasmid pLeIF B
trp 7 DNA; plasmid pLeIF F trp 1 DNA,
plasmid pLeIF C trp 35 DNA, plasmid
pLeIF D trp 11 DNA, plasmid pLeIF H
DNA, plasmid pLeIF I trp 1 DNA a plas-
mid pLeIF J trp 1 DNA v ligačním ústoj-
ném roztoku po dobu 30 minut a
b) provede se selekce transformovaných
E.coli buněk na tuhé vrstvě agaru obsa-
hující tetracyklin.

Konkrétně se používá kmen E.coli K-12
č. 294 ATCC 31446.

Vynález se týká způsobu výroby E.coli buněk schopných produkovat zralý lidský leukocytární interferon s částečnou aminokyselinovou sekvencí Cys-Ala-Trp-Glu-Val-Val-Arg-Ala-Glu-Ile-Met-Arg-Ser se 165 až 166 aminokyselinami a s aminokyselinou Asp; Glu nebo Val v poloze 114 nebo, jestliže je na N-konec první aminokyseliny shora uvedeného interferonu připojen methionin, se 166 až 167 aminokyselinami a s aminokyselinou Asp; Glu nebo Val v poloze 115.

Podstatu způsobu podle vynálezu spočívá v tom, že

a) inkubují se E.coli buňky ošetřené chloridem vápenatým DNA expresním vektorem vybraným ze skupiny zahrnující plasmid pLeIF A trp 25 DNA; plasmid pLeIF B trp 7 DNA, plasmid pLeIF F trp 1 DNA; plasmid pLeIF C trp 35 DNA; plasmid pLeIF D trp 11 DNA; plasmid pLeIF H DNA; plasmid pLeIF I trp 1 DNA a plasmid pLeIF J trp 1 DNA v ligučním ústojném roztoku po dobu 30 minut a

b) provede se selekce transformovaných E-coli buněk na tuhé vrstvě agaru obsahující tetracyklin.

Lidský leukocytární interferon (LeIF) byl poprvé objeven a připraven ve formě valmi surových sraženin Issacsem a Lindemannem (Proc. R. Soc. B 147, 258 až 267 (1957) a USA patent 3 699 222). Od té doby pokračuje snaha o vyčištění a charakterizaci tohoto materiálu. Toto úsilí vedlo k přípravě relativně homogenních leukocytárních interferonů získaných z normálních nebo leukemických donorských leukocytů (NSR patentový zveřejňovací spis č. 2 947 134). Tyto interferony tvoří skupinu bílkovin, o kterých je známo, že mají schopnost udělovat svým cílovým buňkám resistenci vůči virům. Interferon může dále působit inhibičně na proliferaci buněk a modulovat imunitní odpověď. Tyto vlastnosti interferonů inspirovaly jejich klinické použití jako terapeutických prostředků pro léčení virových infekcí a maligních onemocnění.

Leukocytární interferony byly vyčištěny až v podstatě do homogenního stavu /viz Rubinstein a spolupracovníci; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 640-644 (1979); Zeon a spolupracovníci; tamtéž; 76; 5601-5605 (1979)/; a jejich uváděné molekulární hmotnosti se pohybují v rozmezí od asi 17 500 do asi 21 000. Specifická aktivita těchto preparátů je pozoruhodně vysoká; 2×10^8 až 1×10^9 jednotek na mg bílkoviny, ale výtěžky metod používajících buněčných kultur jsou odrazujícím způsobem nízké. Přesto pokroky v pracovních technikách pro stanovení bílkovinných sekvencí dovolily určení částečných sledů aminokyselin v těchto interferonech /viz Zeon a spolupracovníci; Science 207, 527 (1980); Levy a spolupracovníci; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5102-5104 (1980)/. Objasnění glykosylace různých leukocytárních interferonů není ještě v současné době úplné, ale již nyní je zřejmé, že rozdíly v glykosylaci mezi jednotlivými členy skupiny nevysvětlují samy o sobě spektrum pozorovaných molekulových hmotností. Leukocytární interferony se mimo to zjevně liší ve složení a pořadí aminokyselin; a shodnost aminokyselin jest v některých případech nižší než 80 %.

Zatímco izolace interferonů z donorských leukocytů zajistila materiál postačující k částečné charakterizaci a k omezeným klinickým studiím s homogenním leukocytárním interferonem, je tento zdroj zcela nedostatečným pro získávání interferonu v množstvích potřebných pro jeho klinické zkoušení v širokém rozsahu a pro jeho rozsáhlé použití k profylaktickým a/nebo terapeutickým účelům. Současné klinické výzkumy používající interferony získané z lidských leukocytů k testování jejich antineoplastického a antivirového účinku se vskutku principiálně omezily jen na surové preparáty (o čistotě menší než 1 %) a dlouhé doby potřebné pro výrobu dostatečných množství spolu s nereálnou výškou cen kriticky zdržely výzkum na široké frontě.

Nástup technologie rekombinace DNA umožnil kontrolovanou mikrobiální produkci enormní řady užitečných polypeptidů. V současné době jsou již k dispozici bakterie modifikované touto technologií umožňující výrobu takových polypeptidických produktů jako jsou soma-

toestatin; A a B řetězce lidského insulinu a lidský růstový hormon /viz Itakura se spolupracovníky; Science 198; 1056-1063 (1977); Goeddel se spolupracovníky; Nature 281, 544-548 (1979)/. Novější bylo technologií rekombinace DNA použito k bakteriální produkci proinsulinu a thymosinu alfa 1, a řada autorů referuje, že našli DNA kodování pro lidský leukocytární interferon a že vzniklé bílkoviny měly účinnost leukocytárního interferonu (Nagata a spolupracovníci, Nature 284, 316-320 (1980); Mantei a spolupracovníci; Gene 10; 1-10 (1980); Taniguchi a spolupracovníci; Nature 285; 547-549 (1980)/.

Výkonným útvarem při technologii rekombinace DNA je plasmid, chromosomů prostá smyčka dvouvláknové DNA nalezená v bakteriích a v jiných mikrobech, často v mnohonásobných kopiích v jedné bakteriální buňce. V informaci zakódované v plasmidické DNA jest včleněna informace potřebná k reprodukci plasmidu do dceřinných buněk (tzv. replikon) a obvykle jedna nebo více selekčních charakteristik, jako je v případě bakterií rezistence vůči antibiotikům, která dovoluje, že klony hostitelské buňky obsahující plasmid, který je předmětem našeho zájmu mohou být rozpoznány, vybrány a přednostně pěstovány v selektivním růstovém prostředí. Užitečnost bakteriálních plasmidů spočívá ve skutečnosti, že je lze specificky štěpit jednou nebo druhou restrikční endonukleázou neboli "restrikčním enzymem", přičemž každá z těchto endonukleáz rozpoznává na plasmidické DNA odlišné místo štěpení. Po rozštěpení lze do plasmidu vpravit cizorodé (heterologní) geny nebo fragmenty genů buď přímým připojením v místě rozštěpení nebo připojením na rekonstruovaných koncích sousedících s místem rozštěpení. Rekombinace DNA se provádí vně buněk; ale vzniklý "rekombinovaný" plasmid lze zavést do bakteriálních buněk postupem známým jako transformace a kultivací získaného transformantu lze připravit velká množství rekombinovaného plasmidu obsahujícího heterologní gen. Kromě toho, podle toho kam se gen vhodně zavede vzhledem k částem plasmidu, které řídí transkripci (přepis) a translaci (překlad) zakódovaných DNA informací; lze získaný exprese schopný nosič použít k aktuální produkci polypeptidické sekvence; pro kterou je vestavěný gen kodován; tento postup se v popisu vynálezu označuje jako exprese.

Exprese je iniciována v oblasti známé jako promotor; která je rozpoznávána a na kterou se připojuje RNA-polymeraza. V některých případech; jako v případě tryptofanového (trp) promotoru; kterého se s výhodou používá při praktickém provádění způsobu podle tohoto vynálezu; jsou oblasti promotoru překryty oblastmi "operátoru" a vytváří se kombinovaný promotor-operátor. Operátory jsou sekvence DNA, které jsou rozpoznávány tak zvanými represorovými bílkovinami, které slouží k regulování frekvence iniciace transkripce u specifického promotoru. Polymeraza se pohybuje podél řetězce DNA; transkribuje informace obsažené v kódovacím vlákně DNA a jeho 5' konce na 3' konec informační kyseliny ribonukleové (m-RNA) a tyto informace se ihned překládají do polypeptidické sekvence, která má takové pořadí aminokyselin; pro které je příslušná DNA kódována. Každá aminokyselina je zakódována jediným dripletem nukleotidů, neboli "kodenem", pro který je v popisu vynálezu používán termín "strukturální gen" a který označuje tu část DNA; ve které je zakódovaná aminokyselinová sekvence exprimovaného peptidického produktu. Poté, co se RNA polymeraza naváže na promotor, transkribuje nejprve nukleotidy kodováním ribosomového vazebného místa, pak dojde k iniciaci translace neboli k signálu "start"; (obvyčejně kodonem ATG, který se ve vzniklé m-RNA stane AUG) a poté k translaci nukleotidických kodonů uvnitř samotného strukturálního genu. Na konci strukturálního genu se transkribují tak zvané stop-kodony a polymeraza může poté vytvářet další sekvenci m-RNA, která vzhledem k přítomnosti stop-signálu zůstává nepřeložena ribosomy. Ribosomy se naváží na vazebné místo připravené na m-RNA; v bakteriích obvykle poté, co se m-RNA vytvoří, a samy produkují zakódované polypeptidy, počínaje start signálem translace a konče shora zmíněným stop signálem. Žádaný produkt se tvoří jen tehdy, když jsou sekvence kódující vazebné místo ribosomů umístěny správně vzhledem k AUG iniciačnímu kodonu a když všechny zbývající kodony následují za iniciačním kodonem ve správné fázi. Vzniklý produkt lze získat lysou hostitelné buňky a jeho oddělením od ostatních bakteriálních bílkoviny vhodnou čistící metodou.

Autoři vynálezu si uvědomili, že aplikace technologie rekombinace DNA (to je vložení interferonových genů do mikrobiálních exprimačních nosičů a jejich exprese pod kontrolou regulačních prvků mikrobiálního genu) by byla nejefektivnější cestou k zajištění velkých množství leukocytárního interferonu, kterého by se přesto, že by nebyl glykosylován, jak je tomu v případě produktu z lidských leukocytů, dalo klinicky používat při léčení širokého okruhu virových a neoplastických onemocnění.

Podle vynálezu se první leukocytární gen dá připravit následujícím sledem operací:

1) Za použití parciálních aminokyselinových sekvencí lidského leukocytárního interferonu vyčištěných do homogenního stavu se zkonstruuují soubory zkušebních vzorků syntetických DNA, jejichž kodony v celku představují všechny možné nukleotidické kombinace schopné zakódovat zmíněné parciální aminokyselinové sekvence.

2) Připraví se banky bakteriálních kolonií obsahující komplementární DNA (cDNA) z indukované mRNA. Jiné indukované mRNA, radioaktivně označené, se hybridizují do plasmidické cDNA z této banky. Hybridizující mRNA se eluuje a testuje se její schopnost transplantace na interferon pomocí oocytárního testu. Plasmidické DNA z kolonií, u kterých bylo zjištěno, že při tomto způsobu indukují interferonovou aktivitu, se dále testují na jejich schopnost hybridizace do zkušebních vzorků připravených způsobem popsaným výše ad 1).

3) Souběžně s postupem popsaným výše v části 2) se cDNA odvozená z indukované mRNA v plasmidech použije k vytvoření nezávislé banky transformovaných kolonií. Zkušebních vzorků z části 1) se použije k započatí syntézy radioaktivně značených jednovláknových cDNA, kterých se použije jako hybridizačních zkušebních vzorků. Synthetické zkušební vzorky se hybridizují s indukovanou mRNA jakožto šablonou a prodlouží se reversní transkripcí za vzniku indukované, radioaktivně značené cDNA. Klony z banky kolonií, které se hybridizují do radioaktivně značené cDNA získané shora uvedeným postupem, se dále zkouší, aby se potvrdila přítomnost celé délky interferonového kodujícího genu. Jako zkušebních vzorků pro interferonový gen o plné délce lze jako takového použít kteréhokoliv domnělého genového fragmentu s částečnou délkou řetězce, získaného ve shora uvedených oddílech 1) a 2).

4) Interferonový gen o plné délce, získaný shora uvedeným postupem, se za použití syntetické DNA uzpůsobí tak, aby se odstranila jakákoliv vedoucí sekvence, která by mohla zabránit mikrobiální expresi zralého polypeptidu a aby se mu zajistilo vhodné umístění v nosiči schopném exprese vzhledem k iniciačním signálům pro start a k ribosomovému vazebnému místu mikrobiálního promotoru. Expresí získaný interferon se vyčistí do stupně dovolujícího potvrzení jeho charakteru a stanovení jeho aktivity.

5) Interferonový genový fragment připravený shora popsaným způsobem se použije jako takový ke zkoušení, cestou hybridizace, pro přípravu jiných částečně homologických leukocytárních druhů interferonu.

Shora popsanou aplikací metod technologie rekombinace DNA bylo dosaženo mikrobiální produkce, a to ve vysokých výtěžcích a vysoké čistotě, skupiny homologických leukocytárních interferonů (neglykosylovaných) ve formě zralých polypeptidů, nedoprovázených v podstatě odpovídající presekvencí nebo jakoukoliv její částí. Tyto interferony se dají přímo exprimovat, izolovat a čistit do stupně čistoty vhodného pro jejich použití při léčení virových a maligních onemocnění u živočichů a u lidí. Mikrobiální expresí zatím získané produkty této skupiny prokázaly účinnost při testování in vitro, a v prvních zkouškách toho druhu rovněž při testování in vivo, přičemž posléze uvedené testování zahrnovalo i první zralý leukocytární interferon vyprodukovaný mikrobiálním způsobem.

Výraz "zralý leukocytární interferon" používaný v popisu tohoto vynálezu značí mikrobiálně (například bakteriálně) vyprodukovanou interferonovou molekulu, prostou glykosylových skupin. Zralý leukocytární interferon jest při způsobu podle vynálezu bez-

prostředně exprimován počínaje iniciačním signálem pro translaci (ATG) ještě před prvním aminokyselinovým kodonem přirozeného produktu. "Zralý" polypeptid tak může obsahovat jako první aminokyselinu ve své sekvenci methionin (pro který koduje ATG) bez podstatné změny svého charakteru. Na druhé straně může mikrobiální hostitel zpracovat produkt translace tak, že je vynechán počáteční methionin. Zralý leukocytární interferon může být exprimován společně s konjugovanou bílkovinou jiné povahy než je běžná vedoucí bílkovina, přičemž zmíněný konjugát se dá specificky rozštěpit v intra- nebo extracelulárním prostředí (viz britský patent číslo 2 007 676 A). Posléze může být zralý interferon produkován v konjugaci s mikrobiálním "signálním" peptidem, který transportuje konjugát do buněčné stěny, kde se signální peptid odštěpí a vyloučí se zralý polypeptid. Pojem "exprese zralého leukocytárního interferonu" značí bakteriální nebo jinou mikrobiální produkci interferonové molekuly neobsahující glykosylové skupiny ani aminokyselinové presekvenční, které se bezprostředně zúčastňují mRNA translace lidského leukocytárního interferonového genomu.

Specifické leukocytární interferonové bílkoviny uváděné v tomto vynálezu jsou definovány pomocí stanoveného DNA genu (viz obrázky číslo 3 a 8) a podle dedukované aminokyselinové sekvence (viz obrázky 4 a 9). Rozumí se, že u těchto specifických interferonů, i když je lze vskutku všechny zahrnout do skupiny leukocytárních interferonových bílkovin, existují přirozené alelické variace, které se vyskytují od případu k případu. Tyto variace lze demonstrovat rozdílem (nebo rozdíly) v celkové aminokyselinové sekvenci, nebo vynecháním, substitucí, vložním, inverzí nebo přidáním aminokyseliny (nebo aminokyselin) ve zmíněné sekvenci. U každé leukocytární interferonové bílkoviny uvedené v tomto vynálezu, označených symboly LeIF A až LeIF J, jsou zmíněné alelické variace zahrnuty do rozsahu uvedených označení nebo termínů definujících tyto interferony.

Výhodný způsob podle vynálezu jest blíže objasněn v následujícím podrobném popisu a na přiložených obrázcích 1 až 9.

Na obrázku 1 jsou znázorněny dvě aminokyselinové sekvence, které jsou společné všem druhům interferonů izolovaných z lidských leukocytů a vyčištěných do homogenního stavu, označených T-1 až T-15. Všechny možné mRNA sekvence kódující tyto peptidy jsou znázorněny jako odpovídající DNA sekvence. Písmena A, T, G, C a U označují nukleotidy obsahující base adenin, thymín, guanin, cytosin a uracil. Písmeno N označuje kterýchkoliv z uvedených nukleotidů A, G, C a U. Polynukleotidy jsou zobrazeny tak, aby se četly ze směru 5' (zleva) do 3' (doprava), a tam, kde je znázorněna dvouvláknová (d.v.) DNA, se naopak pročítá od spodu nebo od nekódujícího vlákna.

Na obrázku 2 je uveden autoradiogram znázorňující hybridizaci potenciálních LeIF plasmidů se syntetickými deoxyoligenukleotidy značenými ³²P.

Na obrázku 3 jsou znázorněny nukleotidické sekvence (kódující vlákna) osmi genomových fragmentů, které byly izolovány jako možní kandidáti pro použití k expresi leukocytárních interferonů, a které jsou označeny písmeny "A" až "H". Iniciační ATG kodony translace a terminační triplety každého LeIF jsou podtrženy. Stop kodony neboli terminační triplety jsou následovány nepřekládanými oblastmi v poloze 3'. Včleněný gen o plné délce pro LeIF A má vynechaný jeden kodon, který byl nalezen u ostatních nakreslených genů, jak je znázorněno ve třetí A lince obrázku 3. V poloze 5' nepřekládané oblasti předcházejí vedoucím sekvencím. Ve fragmentu E schází po izolaci celá presekvenční vedoucí bílkoviny, ale je zahrnut celý gen pro předpokládaný zralý LwIF E. Ve fragmentu G schází po izolaci celá kódující sekvence.

Na obrázku 4 jest znázorněno srovnání osmi LeIF bílkovinových sekvencí určených nukleotidickými sekvencemi. Pro aminokyseliny jsou používány jednopísmenkové zkratky, doporučené IUPAC-IUB komisí pro biochemickou nomenklaturu: A = alanin; C = cystein; D = kyselina asparagová; E = kyselina glutamová; F = fenylalanin; 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 = tryptofan; a Y = tyrosin.

Číslo označují umístění aminokyselin (S se vztahuje na signální peptid). Pomlčka na místě 44 u sekvence 165 aminokyselin interferonu LeIF A jest zavedena pro vyrovnání zmíněné LeIF A sekvence se sekvencí 166 aminokyselin jiných LeIF. Sekvence LeIF E byla stanovena za zanedbání extranukleotidu (poloha 187 na obrázku 3) v jeho kódující oblasti. Hvězdičky označují terminační kodony, které jsou ve fázi. Aminokyseliny společné všem LeIF (s výjimkou pseudogenu LeIF E) jsou rovněž zřejmé. Podtržené zbytky jsou aminokyseliny, které jsou rovněž přítomné v lidském fibroblastovém interferonu.

Na obrázku 5 jsou zobrazeny mapy restrikčních endonukleáz osmi typů (A až H) cDNA klonovaných interferony LeIF. Hybridizované plasmidy byly zkonstruovány za použití metody dC:dG koncových zbytků (Goeddel D.V. a spolupracovníci, Nature 287, 411-416 (1980)). Při této metodě se "výřiznou" vložky cDNA za použití restrikční endonukleázy PstI. Čáry na konci každé cDNA vložky představují přilehlé homopolymerní dC:dG koncové zbytky. Na obrázku je rovněž označeno umístění PvuII, EcoRI a BglII štěpných míst. Stínované oblasti obrázku značí kódující sekvence zralých LeIF; šrafované oblasti označují sekvence kódující signální peptid; volné oblasti znázorňují 3' a 5' nekódující sekvence.

Na obrázku 6 je schematicky zobrazena konstrukce genu kódujícího přímou mikrobiální syntézu zralého LeIF A. Jsou vyznačena místa štěpení a vzniklé zbytky ("Pst I"; atd.). Zkratka "b.p." označuje "pár basí".

Na obrázku 7 je schematicky znázorněna restrikční mapa dvou genových fragmentů používaných k expresi zralého leukocytárního interferonu LeIF B. Vyznačené kodonové sekvence jsou kódující koncová vlákna získaná digesí restrikčním enzymem Sau3a v uvedených dvou případech.

Na obrázcích 8 a 9 jsou uvedeny DNA a aminokyselinové sekvence (pokud se týká příslušných jednopísmenných zkratk aminokyselin viz shora uvedený popis k obrázku 4) pěti LeIF bílkovin, včetně typu I a J. Hvězdička na obrázku 9 označuje terminační kodon příslušné DNA sekvence a rozdělovací čárka značí delecí nebo mezeru v sekvenci.

A. Použité mikroorganismy

Způsob podle vynálezu zahrnuje používání dvou mikroorganismů: bakterie *E. coli* x 1776, jak je popsáno v USA patentu číslo 4 190 495, a bakterie *E. coli* K-12 kmen 294 (zakončení A; thi^- , har^- , hsm_K^+), jak je popsáno v britském patentu číslo 2 055 382 A. Každý z těchto mikroorganismů je uložen v Americké sbírce typových kultur (ATCC) pod označením ATCC číslo 31537 a 31446. Všechny práce s rekombinovanými DNA byly prováděny v souladu se závaznými směrnicemi Národního zdravotnického úřadu (NIH) v USA.

Způsob podle vynálezu ve svém nejvýhodnějším provedení jest popsán za použití mikroorganismů *E. coli*, včetně nejen kmenů *E. coli* x 1776 a *E. coli* K-12 kmene 294, uvedených výše, ale i jiných známých kmenů *E. coli*, jako *E. coli* B, nebo jiných mikrobiálních kmenů, z nichž četné jsou uloženy a dostupné ve známých sbírkových ústavech, jako v Americké sbírce typových kultur; viz též NSR patentový zveřejňovací spis 2 644 432. Mezi zmíněnými jinými mikroorganismy jsou zahrnuty například kmeny *Bacilli*, jako například *Escherichia coli* *subtilis*, a jiné enterobakteriální mikroorganismy, mezi kterými lze uvést například kmeny *Salmonella typhimurium* a *Serratia marcescens*, které využívají plasmidů a jsou schopné replikace a exprese heterologních genových sekvencí v nich obsažených.

Jako hostitelského organismu pro přípravu interferonových bílkovin expresí genů pro ně kódovaných; za kontroly kvasinkového promotoru; lze rovněž používat s výhodou kvasínek; jako *Saccharomyces cerevisiae*.

B. Zdroj a čištění leukocytární interferonové mRNA (LeIF mRNA)

LeIF mRNA lze získávat z lidských leukocytů; obvykle z leukocytů nemocných s chronickou myeloidní leukémií; tyto leukocyty lze indukovat k produkci interferonu virem Sendaiské nebo Newcastleské nemoci; jak je popsáno například v NSR patentovém zveřejňova-

cím spisu číslo 2 947 134. Zvláště výhodným zdrojem, používaným rovněž v této práci, je linie buněk označená KG-1; získaná od nemocných s akutní myeloidní leukémií. Tato linie buněk, popsaná H.P. Koefflerem a D.W. Goldem v časopisu *Science* 200; 1153 (1978); ochotně roste v kultivačním mediu obsahujícím RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 plus 10 % FCS (fetální telecí sérum) inaktivované zahřátím; 25 mM pufru HEPES (N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonová kyselina) a 50 µg/ml gentamicinu; a subkultivuje se na jedno až tři rozdělení dvakrát za týden. Buňky z předcházejícího kultivačního prostředí se zmrazí s 10 % DMSO (dimethylsulfoxidu). Buňky KG-1 jsou uloženy v Americké sbírce typových kultur pod označením ATCC číslo CRL 8031.

Buňky KG-1 se indukují k produkci leukocytární interferonové mRNA virem Sendaiské nebo Newcastleké nemoci způsobem popsaným Rubinsteinem a spolupracovníky /viz časopis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76; 640-644 (1979)/. Buňky se izolují za 5 hodin po indukci a RNA se připravuje postupem za použití thiokyanátu guanidinu s hydrochloridem guanidinu /viz Chirgwin a spolupracovníky; *Biochemistry* 18, 5294-5299 (1979)/. Stejným způsobem se izoluje RNA z neindukovaných buněk. Za použití chromatografie na oligodeoxythymidin (dT) - celulóze a ultracentrifugace se sacharosovým gradientem se získá 12S frakce poly(A) mRNA, jak popisují Green a spolupracovníci /*Arch. Biochem. Biophys.* 172; 74-89, (1976)/ a Okimura a spolupracovníci /*Arch. Biochem. Biophys.* 188; 98-104 (1978)/. Takto získaná mRNA má interferonovou aktivitu 8000 až 10 000 jednotek na mikrogram při oocyto-ovém stanovení za užití žáby *Xenopus Laevis* /viz Cavalieri a spolupracovníci, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74; 3287-3291 (1977)/.

C. Příprava bank kolonií obsahujících LeIF cDNA sekvence

Za použití 5 µg mRNA se standardními postupy připraví dvouvláknová cDNA /viz Wickens a spolupracovníci; *J. Biol. Chem.* 253; 2483-2495 (1978) a Goeddel a spolupracovníci *Nature* 281, 544-548 (1979). Získaná cDNA se frakcionuje podle velikosti elektroforesou na 6%ním polyakrylamidovém gelu (PAGE); a elektroelucí se izoluje 230 ng materiálu majícího velikost v rozmezí od 500 do 1300 b.p. U části této cDNA (100 ng) se nakonec naváží zbytky deoxycytidinu (dC) způsobem popsaným Changem a spolupracovníky v časopisu *Nature* 275, 617-624 (1978); produkt se analýzuje se 470 plasmidu pBR322; na jehož Pst I restrikční místo jsou navázány zbytky desoxyguanidinu (dG) /viz Bolivar a spolupracovníci; *Gene* 2, 95-113 (1977)/ a takto modifikovaného plasmidu se použije k transformaci mikroorganismu *E. coli* x 1776. Získá se asi 130 transformantů rezistentních vůči tetracyklinu a citlivých na ampicilin; na jeden ng cDNA.

V druhém podobném pokusu se získá přibližně 1000 transformantů *E. coli* K-12 kmene 294; rezistentních vůči tetracyklinu a citlivých na ampicilin; na jeden ng cDNA. V tomto případě se frakcionací cDNA podle velikosti molekul a elektroelucí získá materiál o velikosti v rozmezí od 600 do 1300 b.p., který se použije k navázání koncových dC.

D. Příprava syntetických oligonukleotidů a jejich použití

Znalost aminokyselinových sekvencí různých tryptických fragmentů lidského leukocytárního interferonu dovoluje navrhnout syntetické desoxyoligonukleotidy komplementární k různým oblastem LeIF mRNA. Byly zvoleny dva tryptické peptidy T 1 a T 13; poněvadž mají aminokyselinovou sekvenci vyžadující syntézu pouze 12; popřípadě 4 undekamerů; aby se vyvětlily všechny možné kódující sekvence (viz obrázek 1). Syntetizují se čtyři soubory zkušebních vzorků desoxyoligonukleotidů pro každou sekvenci; z nichž každý obsahuje buď tři (T-1A, B, C; D) nebo jeden (T-13A; B; C, D) oligonukleotid. Uvedené komplementární desoxyoligonukleotidy o délce 11 basí se syntetizují chemicky za použití fosfortriesterové metody /viz Grea a spolupracovníci; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75; 5765-5769 (1978)/. V T-13 sérii se připraví čtyři jednotlivé vzorky, v sérii T-1 dvanáct vzorků ve čtyřech skupinách po třech vzorcích, jak je uvedeno na obrázku 1.

Čtyři individuální zkušební vzorky v T-13 sérii a dvanáct T-1 zkušebních vzorků při-

pravených ve čtyřech skupinách po třech primérech v každé se použijí k informační syntéze se radioaktivně značené jednovláknové cDNA za účelem použití k hybridizačním zkouškám. Jako vzorové mRNA se použije buď 12S RNA z KG-1 buněk indukovaných Sendaiským virem (8000 jednotek IF aktivity na jeden μg) nebo celkové poly(A) mRNA z neindukovaných leukocytů (aktivita menší než 10 jednotek na μg). Z uvedených primérů se připraví cDNA značená ^{32}P za použití známých reakčních podmínek /viz Noyes a spolupracovníci, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76; 1770-1774 (1979)/. Reakce se provedou v 60 mikrolitrových pufrech o složení 20 mM Tris-HCl (hydrochlorid tris-hydroxymethylmethanu) o pH 8,3, 20 mM chloridu draselného, 8 mM bezvodého chloridu hořečnatého a 30 mM β -merkapt ethanolu. Pro reakce se použije vždy jednoho μg každého primeru (tj. celkem 12 μg pro primery T-1 série a celkem 4 μg pro T-13 série), 2 μg "indukované" 12S frakce mRNA (nebo 10 μg neindukované poly(A) mRNA); 0,5 mM dATP; dCTP; dTTP, 200 μCi (α - ^{32}P)dCTP (dodavatel Amersham, 2000-3000 Ci/mmol) a 60 jednotek reversní transkriptázy (dodavatel Bethesda Research Laboratories). Žádaný produkt se oddělí od neinkorporovaného značkovacího materiálu gelovou filtrací na sloupci 10 ml Sephadexu[®] G-50 a produkt se zahřívá 30 minut na 70 $^{\circ}\text{C}$ s 0,3 N roztokem hydroxidu sodného, aby se rozložila RNA; a pak se směs zneutralizuje kyselinou chlorovodíkovou. Hybridizace se provedou způsobem popsaným Kafatosem a spolupracovníky v časopisu Nucleic Acids Res. 7; 1541-1552 (1979)/.

E. Identifikace klonů pL1 až pL30

K přípravě 1 μg plasmidické DNA z každého z 500 individuálních transformantů E. coli K-12, kmene 294 (viz oddíl C) se použije rychlého způsobu izolace plasmidu popsaného Birnboimem a spolupracovníky v časopisu Nucleic Acids Res. 7; 1513-1523 (1979). Každý získaný vzorek DNA se denaturuje a pak aplikuje trojmo na nitrocelulosový filtr podle postupu popsaného Kafatosem a spolupracovníky (viz výše).

Tři shora uvedené soubory nitrocelulosových filtrů obsahující 500 plasmidických vzorků se hybridizují

- a) s indukovanou cDNA obsahující T-1 soubor primérů;
- b) s indukovanou cDNA obsahující T-13 priméry, a
- c) s neindukovanou cDNA připravenou za použití obou souborů primérů.

Klony se považují za pozitivní, když hybridizují silněji na jednom nebo obou vzorcích indukované cDNA než na celkovém neindukovaném vzorku. Z výchozích 500 vzorků plasmidů bylo vybráno třicet pozitivních klonů (pL1 až pL30) k další analýze.

F. Identifikace klonů pL31 až pL39. Izolace plasmidu číslo 104 obsahujícího LeIF genový fragment

Transformanty mikroorganismů E. coli x 1776 se podrobí užšímu výběru metodou koloniové hybridizace podle Grunsteina a Hognesse /viz Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72; 3961-3965 (1975)/ za použití ^{32}P značené indukované mRNA jako zkušební vzorku /viz Lillenhaug a spolupracovníci; Biochemistry 15; 1858-1965 (1976)/. Neznačná mRNA z neindukovaných buněk se smísí se zkušebním vzorkem v poměru 200:1; aby došlo ke kompetici s neindukovanou mRNA přítomnou v preparátu značeném ^{32}P . Hybridizace značené mRNA nastává přednostně s koloniemi obsahujícími indukované sekvence. Získají se tři druhy transformantů:

- 1) 2 až 3 % kolonií hybridizovaných na ^{32}P -mRNA velmi silně;
- 2) 10 % kolonií hybridizovaných signifikantně méně než ve skupině 1); a
- 3) zbytek; který nedává detegovatelný hybridizační signál;

Positivní kolonie (skupiny 1 a 2) se testují na přítomnost sekvencí specifických pro interferon pomocí zkoušky, která spočívá v hybridizaci interferonové mRNA specificky na plasmidickou DNA. Nejprve se 60 silně pozitivních kolonií (ze skupiny 1) kultivuje individuálně ve 100 ml živného prostředí M9; doplněného tetracyklinem (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$); kyselinou diaminopimelovou (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$); thymidinem (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a d-biotinem (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Živná půda M9 obsahuje v 1 litru hydrogenfosforečnan sodný (6 g), dihydrogenfosforečnan

draselný (3 g), chlorid sodný (0,5 g) a chlorid amonný (1 g); po vysterylizování v autoklávu se přidá 1 ml sterilního 1M roztoku síranu hořečnatého (bezvodého) a 10 ml sterilního 0,01 M roztoku bezvodého chloridu vápenatého. Kultury se spojí po deseti a ze šesti uvedených spojených skupin se izoluje plasmidická DNA způsobem popsaným Clewellem a spolupracovníky v časopisu *Biochemistry* 9, 4428-4440 (1970). Deset μ g plasmidické DNA z každé skupiny se rozštěpí enzymem HindIII, směs se denaturuje a kovalentně naváže na DBM-papír (diazobenzylloxymethylovaný filtrační papír). Jeden μ g přečištěné mRNA z indukovaných buněk se hybridizuje s rozštěpenou DNA vázanou na DBM-papíru. Nezhybridizovaná mRNA se odstraní promytím, specificky hybridizovaná mRNA se eluuje a testuje pomocí oocytů *Xenopus laevis*. V tomto testu bylo všech šest skupin negativních. Z 59 slabě pozitivních kolonií (skupina 2) bylo vytvořeno pět skupin po 10 koloniích a jedna skupina z 9 kolonií, a z těchto skupin byly shora uvedeným způsobem připraveny plasmidy, které byly zhodnoceny jak bylo uvedeno výše. Z šesti testovaných skupin hybridizovala jedna (K 10) na interferonovou mRNA a vykazovala v každé době testování hladiny signifikantně vyšší než byly základní hladiny. Za účelem identifikování specifického interferonového cDNA klonu se z 9 kolonií skupiny K 10 připraví plasmidická DNA a testují se individuálně. Dva ze zmíněných plasmidů (číslo 101 a číslo 104) vázaly interferonovou mRNA signifikantně nad základní hladiny. Z plasmidu číslo 104 byl izolován unikátní Bgl II restriční fragment obsahující 260 b.p., označen radioaktivním ^{32}P způsobem popsaným Taylorem a spolupracovníky v časopisu *Biochim. Biophys. Acta* 442, 324-330 (1976) a použit jako zkušební vzorek k nezávislému výběrovému hodnocení na 400 transformantech *E. coli* 294 za použití skríningové metody na koloniích in situ /viz Grunstein a Hogness, *Proc. Natl. Sci. USA* 72, 3961-3965 (1975)/. Bylo identifikováno devět kolonií (pL31 až pL39), které hybridizovaly v tomto testu do rozdílného stupně.

Shora uvedený značený fragment o 260 b.p. byl dále použit v nezávislém skríningu na 4000 transformantech *E. coli* 294 stejným způsobem. Bylo identifikováno 50 kolonií, které v tomto testu hybridizovaly se zkušebním vzorkem do rozdílných stupňů. Jedna z nich obsahovala LeIF G fragment, jedna LeIF H fragment a jedna obsahovala fragment označený jako LeIF H1, zřejmou alelickou variantu interferonu LeIF H. Hybridní plasmidy, které byly uvedeným způsobem získány, byly označeny jako "pLeIF H", atd.

G. Izolace a stanovení sekvence prvního LeIF genu a plné délce řetězce

Ze všech 39 potenciálních LeIF cDNA klonů se připraví plasmidická DNA, které se znovu podrobí dalšímu výběru se stejným zkušebním vzorkem DNA obsahujícím 260 b.p., za použití hybridizačního postupu popsaného Kafatosem a spolupracovníky (viz výše). Tři plasmidy (pL 4, pL 31, pL 34) dávaly při tomto skríningu velmi silné hybridizační signály, čtyři (pL 13, pL 30, pL 32, pL 36) hybridizovaly mírně a tři (pL 6, pL 8, pL 14) hybridizovaly se zkušebním vzorkem slabě.

Shora uvedených 39 potenciálních LeIF cDNA rekombinovaných plasmidů bylo rovněž podrobeno výběrovému testování za použití syntetických undekamerů značených radioaktivním ^{32}P (skupiny individuálních T-1 primérů nebo individuálních 7-13 primérů) přímo jako hybridizačních zkušebních vzorků. Hybridizační podmínky byly zvoleny tak, aby mohlo dojít k dokonalému párování basí pro detegovatelné hybridizační signály /viz Wallace a spolupracovníci, *Nucleic Acids Res.* 6, 3543-3557 (1979)/. Tak byly z 39 klonů připraveny standardním lysátovým postupem (viz Clewell a spol., shora uvedená citace) plasmidická DNA, které byly čištěny sloupcovou chromatografií na agarose značky Biorad Agarose A-50. Vzorky (3 μ g) každého preparátu byly linearizovány působením restričního enzymu Eco RI, denaturovány alkálií a naneseny na 3 separátní nitrocelulosové filtry v dávce 1,5 μ g na jednu nanášku (dle Kafatose a spolupracovníků, citaci viz výše). Individuální syntetické deoxyoligonukleotidické priméry a skupiny spojených primérů byly fosforylovány pomocí (γ - ^{32}P) ATP následujícím způsobem: 50 pmol oligonukleotidu a 100 pmol znače-

ného ($\gamma^{32}\text{P}$)-ATP (dodavatel New England Nuclear, aktivita 2500 Ci/mmol) bylo vneseno do 30 mikrolitrů pufru složeného z 50 mM Tris-HCl, 10 mM bezvodého chloridu hořečnatého a 15 mM β -merkaptoethanolu. Ke směsi byly přidány 2 jednotky polynukleotidické kinasy T 4 a po 30 minutách zahřívání na 37 °C byly vzniklé ^{32}P značené primery čištěny chromatografií na sloupcích z 10 ml Sephadexu [®] G-50. Poté byly provedeny hybridizace za použití 10^6 cpm primeru T-130 nebo 3×10^6 cpm spojených primerů T-10. Hybridizace byly prováděny při 15 °C po dobu 14 hodin v prostředí 6 x SSC (1 x SSC = 0,15 M chlorid sodný a 0,015 M citrát sodný, pH 7,2) a 10 x Denhardtova roztoku (0,2 % hovězího serumalbuminu, 0,2 % polyvinylpyrrolidon, 0,2 % Ficoll); způsobem popsaným Wallacem a spolupracovníky (citaci viz výše). Filtry byly promývány po dobu 5 minut (3krát) při 0 °C v 6 x SSC, vysušeny a exponovány na film citlivý na X-papírsky. Výsledky získané s ^{32}P značenými spojenými primery T-13C a s primerem T-1C jsou uvedeny na obrázku 2.

Bylo nalezeno, že dochází k signifikantní hybridizaci plasmidické DNA z klonu 104 se skupinou spojených primerů T-1C a s primerem T-13C, ale nedochází k detegovatelné hybridizaci s jinými undekamery. Jak je znázorněno na obrázku 2, čtené z uvedených 39 potenciálních LeIF plasmidů (pL 2, 4; 13, 17; 20; 30; 31, 34) rovněž hybridizují s oběma těmito zkušebními vzorky. Avšak restrikční endonukleázovou analýzou bylo zjištěno, že pouze jeden z těchto plasmidů, plasmid pL 31, obsahuje rovněž interní BglII fragment o 260 b.p. Digestí pL 31 restrikčním enzymem PstI bylo zjištěno, že velikost této cDNA vložky je přibližně 1000 b.p.

U posléze uvedené úplné PstI vložky plasmidu pL 31 byla analyzována nukleotidická sekvence jednak Maxamovou-Gilbertovou chemickou metodou /viz časopis *Methods Enzymol.* 65, 499-560 (1980)/ a jednak postupem stanovujícím zakončení dideoxydového řetězce /viz Smith, *Methods Enzymol.* 65, 560-580 (1980)/ po subklonování Sau 3a fragmentů do M13 vektoru. Sekvence DNA jest znázorněna na obrázku 3 pod označením "A". Příslušná translační pročitací konstrukce zmíněné DNA se dá předpovědět z informací, které jsou k dispozici o sekvenci aminokyselin interferonové bílkoviny, ze známého rozmezí molekulárních hmotností LeIF a z relativního výskytu stop-tripletů ve třech možných pročitacích konstrukcích, a poznaná nukleotidická sekvence dovoluje naopak předpovídat aminokyselinovou sekvenci celého LeIF, včetně prosekvence neboli signálního peptidu. První ATG iniciační kodon translace byl nalezen ve vzdálenosti 60 nukleotidů od 5' konce sekvence, a je následován o 188 kodonů později TGA terminačním tripletem; pak je 342 nepřekládaných nukleotidů na 3' konci, následovaných poly (A) sekvencí. Domnělý signální peptid (pravděpodobně zahrnutý do sekrece zralého LeIF z leukocytů) má délku 23 aminokyselin. Zralý LeIF tvořený 165 aminokyselinami má vypočítanou molekulovou hmotnost 19390. Autoři vynálezu označili LeIF zakódovaný do plasmidu pL 31 jako "LeIF A". Z údajů o sekvenci (viz "A" na obrázku 4) je zřejmé, že tryptické peptidy T1 a T13 interferonu LeIF B odpovídají aminokyselinám 145-149; popřípadě 57 až 61, interferonu LeIF A. Skutečné DNA kódující sekvence nalezené v těchto dvou oblastech odpovídají sekvencím reprezentovaným spojenými primery T 1-C a primerem T 13-C (viz obrázek 8).

H. Přímá exprese zralého leukocytárního interferonu A (LeIF A)

1. Obecně

Následující způsob exprese interferonu LeIF A přímo ve formě zralého interferonového polypeptidu je variantou postupu použitého dříve pro přípravu lidského růstového hormonu (Goeddel a spolupracovníci, *Nature* 281, 544-548 (1979)/ do té míry, že zahrnuje kombinování syntetické (N-terminální a komplementární DNA).

Jak je znázorněno na obrázku 6, místo štěpení restrikční endonukleázou Sau3a je výhodně umístěno mezi kodony 1 a 3 interferonu LeIF A. Byly určeny dva syntetické deoxyoligonukleotidy, které inkorporují ATG iniciační kodon pro translaci, obnovují kodon pro aminokyselinu 1 (cystein) a vytváří záchytný ("lepivý") EcoRI konec. Tyto oligomery

byly navázány na fragment o 34 b.p. mezi Sau3a - AvaII místy plasmidu pL31. Získaný produkt o 45 b.p. byl navázán na další DNA fragmenty a tak byl zkonstruován syntheticko-přirozený gen o 865 b.p., který kóduje interferon LeIF A a který je navázán EcoRI a PstI restrikčními místy. Tento gen byl včleněn do plasmidu pBR 322 mezi jeho EcoRI a PstI restrikční místa za vzniku plasmidu pLeIF A1.

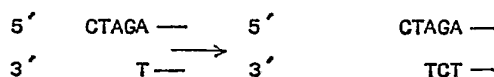
2. Zkonstruování tryptofanového kontrolního prvku (obsahujícího E. coli trp promotor a operátor; a trp hlavní ribosomové vazebné místo, ale kterému schází ATG sekvence pro iniciaci translace)

Plasmid pGMI nese tryptofánový (trp) operon bakterií E. coli, mající delecii Δ LE1413 /viz Miozzari a spolupracovníci, J. Bacteriology 133, 1457-1466 (1978)/ a proto exprimuje fuzovanou bílkovinu obsahující prvních 6 aminokyselin vedoucí trp sekvence a přibližně poslední třetinu trp E polypeptidu (v dalším označovaný jako LE'), a rovněž exprimuje trp D polypeptid jako celek, vše pod kontrolou tryptofanového promotorového-operátorového systému. Plasmid (20 μ g) se digeruje restrikčním enzymem PvuII, který rozštěpí plasmid na pěti místech. Genové fragmenty se pak zkombinují s EcoRI spojovacími články (sestavujícími z vlastního komplementárního oligonukleotidu o sekvenci pCATGAATTCATG), které obsahují EcoRI restrikční místo potřebné pro pozdější klonování do plasmidu obsahujícího EcoRI místo. Na fragmenty DNA (20 μ g) získané z pGMI se působí 10 jednotkami DNA ligázy T_4 v přítomnosti 200 pmol 5'-fosforylovaného syntetického oligonukleotidu pCATGAATTCATG a v prostředí 20 mikrolitrů T_4 DNA ligasového pufru (20mM Tris, pH 7,6, 0,5 mM ATP, 10 mM bezvodého chloridu hořečnatého, 5 mM dithiothreitolu) při 4 °C přes noc. Roztok se pak zahřívá 10 minut na 70 °C, aby se spojování zastavilo. Spojovací články se rozštěpí digescí endonukleázou EcoRI, vzniklé fragmenty, nyní s EcoRI konci, se oddělí za použití PAGE elektroforezy (5%ní gel) a tři největší fragmenty se izolují, po předchozím obarvení ethidiumbromidem a detekci v ultrafialovém světle, vyříznutím příslušné části gelové vrstvy obsahující žádaný fragment. Každý z uvedených gelových fragmentů se umístí spolu s 300 mikrolitry 0,1 x TBE pufru (TBE pufr obsahuje 10,8 Tris-base, 5,5 g kyseliny borité a 0,09 g dvojsodné soli kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na_2EDTA) v 1 litru vody) do dialyzačního vaku a podrobí elektroforese při 100 V po dobu jedné hodiny v 0,1 x TBE pufru. Vodný roztok z dialyzačního vaku se vyjme, extrahuje fenolem, extrahuje chloroformem, upraví na 0,2 M roztok chloridem sodným a DNA se získá, po vysrážení ethanolém, ve vodném prostředí. Získaný gen s EcoRI zachytnými konci, obsahující trp promotor-operátor, se identifikuje dále popsaným způsobem; který spočívá ve vpravení fragmentů do plasmidu citlivého na tetracyklin; který se po zmíněném začlenění fragmentu stane rezistentním vůči tetracyklinu.

Plasmid pBRHI /viz Rodriguez a spolupracovníci, Nucleic Acids Res. 6, 3267-3287 (1979)/ exprimuje ampicilinovou rezistenci a obsahuje gen pro tetracyklinovou rezistenci, ale poněvadž není spojen s promotorem, posléze uvedenou rezistenci neexprimuje. Plasmid je proto citlivý vůči tetracyklinu. Vpravením promotorového-operátorového systému do EcoRI místa štěpení plasmidu se plasmid stane rezistentním vůči tetracyklinu.

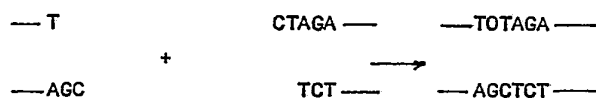
Za tím účelem se plasmid pBRHI digeruje restrikční endonukleázou EcoRI; enzym se odstraní fenolovou extrakcí a následující chloroformovou extrakcí a po vysrážení ethanolém se DNA získá ve vodném prostředí. Získaná molekula DNA se pomocí T_4 DNA ligázy, v oddělených reakčních směsích; váže shora popsaným způsobem a každým ze tří DNA fragmentů získaných shora uvedeným postupem. Vzniklá DNA, obsažená v reakční směsi, se použije k transformaci příslušných bakterií E. coli K-12, kmene 294, za použití standardních pracovních technik /viz Hershefield a spolupracovníci, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3455-3459 (1974)/. Bakterie se pak umístí na LB (Luria-Bertani) agarové desky obsahující 20 μ g/mol ampicilinu a 5 μ g/ml tetracyklinu. Kolonie bakterií rezistentních na tetracyklin se vyberou, izoluje se plasmidická DNA a přítomnost žádaného fragmentu se potvrdí restrikční enzymatickou analýsou. Získaný plasmid byl označen jako pBRHtrp.

Digestí virového genomu hepatitidy B enzymy EcoRI a BamHI se obvyklým způsobem získá produkt, který se začlení do EcoRI a BamHI restrikčních míst plasmidu pGH6 /viz Goeddel a spolupracovníci; Nature 281, 544 (1979)/ za vzniku plasmidu pHS32. Získaný plasmid pHS32 se rozštěpí enzymem XbaI; směs se extrahuje fenolem, pak se extrahuje chloroformem a vysráží ethanolém. Na získaný rozštěpený plasmid se pak působí 1 mikrolitrem *E. coli* DNA polymerázy I; Klenowovým fragmentem (Boehringer-Mannheim) v prostředí 30 mikrolitrů polymerázového pufru (tj. 50 mM fosforečnanu draselného; pH 7,4; 7 mM bezvodého chloridu hořečnatého a 1 mM β -merkapt ethanolu), obsahujícího 0,1 mM dTTP a 0,1 mM dCTP, po dobu 30 minut při 0 °C a pak 2 hodiny při 37 °C. Při této reakci se doplní dva ze 4 nukleotidů komplementárních k 5' vyčnívajícímu konci XbaI štěpícího místa:

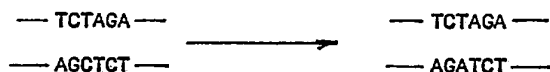


Inkorporují se dva nukleotidy, dC a dT, a vznikne konec se dvěma 5' vyčnívajícími nukleotidy. Tento lineární zbytek plasmidu pHS32 (izolovaný po extrakci fenolem, extrakci chloroformem a vysrážení ethanolém ve vodném prostředí) se rozštěpí restrikčním enzymem EcoRI. Velký plasmidický fragment se oddělí od menšího EcoRI - XbaI fragmentu PAGE elektroforézou a izoluje se elektroelucí. Tento DNA-fragment plasmidu pHS32 (0,2 μ g) se naváže, za podmínek podobných těm, které byly popsány výše, na EcoRI - TaqI fragment tryptofánového operonu (0,01 μ g) získaného z pBRHtrp.

Při tomto shora popsaném postupu navazování fragmentu z plasmidu pHS32 na EcoRI - TaqI fragment se TaqI vyčnívající konec naváže na XbaI zbývající vyčnívající konec, i když jeho base nejsou kompletně spárovány podle Watsonova a Crickova principu:



Část takto získané reakční směsi ligantů se transformuje do buněk bakterií *E. coli* 294, pak se na buňky působí teplem a přeočkují se na LB agarové desky obsahující ampicilin. Selekcí se získá 24 kolonií rezistentních vůči ampicilinu, které se kultivují dále na 3 ml LB půdy (Luria-Bertani) a plasmid se izoluje. Šest z těchto plasmidů má XbaI štěpné místo regenerované pomocí bakteriemi *E. coli* katalysovaného přepárování a replikace DNA:



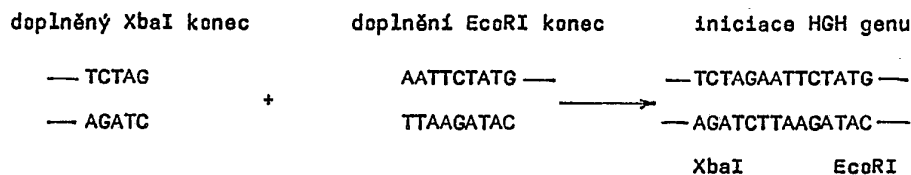
Rovněž bylo nalezeno, že se tyto plasmidy štěpí jak restrikčním enzymem EcoRI; tak enzymem HpaI, a že poskytují očekávané štěpné fragmenty. Jeden z těchto plasmidů; označený pTrp14, byl použit pro expresi heterologních polypeptidů, jak je popsáno dále.

Plasmid pGH 107 /viz Goeddel a spolupracovníci, Nature 281, 544 (1979)/ obsahuje gen pro lidský růstový hormon, složený z 23 aminokyselinových kodonů produkovaných ze syntetických DNA fragmentů, a ze 163 aminokyselinových kodonů získaných z komplementární DNA vytvořené cestou reverzní transkripce informační RNA pro lidský růstový hormon. Tento gen; i když mu schází kodony "pre"-sekvence lidského růstového hormonu; obsahuje ATG kodon pro iniciaci translace. Gen se izoluje z 10 μ g plasmidu pGH 107 postupem zahrnujícím nejprve působení restrikčního enzymu EcoRI a poté připojení dTTP a dATP na získaný fragment působením Klenowova fragmentu *E. coli* DNA polymerázy I; jak bylo popsáno výše. Vzniklý plasmid se izoluje extrakcí fenolem, extrakcí chloroformem a vysrážením ethanolém; a poté se rozštěpí enzymem BamHI.

Vzniklý fragment obsahující gen pro lidský růstový hormon ("HGH") se izoluje PAGE elektroforesou a následující elektroelucí. Výsledný fragment DNA obsahuje rovněž prvních 350 nukleotidů strukturálního genu pro rezistenci vůči tetracyklinu, ale chybí mu tetracyklinový promotorový-operátorový systém; takže, když se v následujícím postupu tento fragment začlení do plasmidu, který je schopný exprese, lze plasmidy obsahující tuto vložku určit podle obnovení tetracyklinové rezistence. Protože EcoRI zakončení fragmentu je doplněno postupem za použití Klenowovy polymerazy I, má zmíněný fragment jeden "tupý" a jeden "lepivý" konec, což mu zajišťuje správnou orientaci, když je později včleněn do plasmidu schopného exprese.

V dalším se připraví exprese schopný plasmid pTrp 14 tak, aby mohl přijmout shora uvedeným způsobem získaný fragment obsahující HGH gen. Plasmid pTrp 14 se za tím účelem digeruje restriktivním enzymem XbaI a a vzniklé "lepivé" konce fragmentu se doplní postupem s Klenowovou polymerazou I za použití trifosfátů dATP, dTTP, dGTP a dCTP. Po extrakci získané směsi fenolem, extrakci chloroformem a vysrážení ethanolom se na získanou DNA působí enzymem BamHI a vzniklý velký fragment plasmidu se izoluje PAGE elektroforesou a elektroelucí. Uvedený fragment odvozený od pTrp 14 má jeden tupý a jeden lepivý konec, které mu zajišťují správnou orientaci při rekombinaci s výše popsaným fragmentem obsahujícím HGH gen.

Fragment obsahující HGH gen a posléze uvedený fragment pTrp 14△Xba - BamHI se zkombinují a navzájem naváží za podmínek podobných těm, které byly popsány výše. Doplněné baI a EcoRI konce se naváží spolu s tupými vazebnými konci za obnovení obou XbaI a EcoRI štěpných míst:



Touto konstrukcí se rovněž obnoví rezistence genu vůči tetracyklinu. Jelikož plasmid pHGH 107 exprimuje tetracyklinovou rezistenci z promotoru ležícího "proti proudu" od HGH genu (lac promotor), umožňuje tato výsledná konstrukce plasmidu, označeného jako pHGH 207, exprese genu pro tetracyklinovou rezistenci za kontroly tryptofanového promotoru-operátoru. Směs produktů ligace se transformuje do bakterií E. coli 294 a po kultivaci na LB agarových deskách s půdou obsahující 5 µg/ml tetracyklinu se vyberou rezistentní kolonie.

Plasmid pHGH 207 se digeruje restriktivním enzymem EcoRI a PAGE elektroforesou a následující elektroelucí se izoluje fragment o 300 b.p. obsahující trp promotor, operátor a vazebné místo pro tryptofanový hlavní ribosom, kterému však schází ATG sekvence pro iniciaci translace. Tento DNA fragment se zaklonuje do EcoRI štěpného místa plasmidu pLeIF A. Expresce schopné plasmidy obsahující shora uvedený modifikovaný trp regulon (trp operon bakterie E. coli, ze kterého je vynechána útlumová sekvence, aby se kontrolovatelně zvýšily hladiny exprese) lze kultivovat do stadia předem stanovených hladin na živné půdě obsahující přídatný tryptofan v množství dostatečném k potlačení promotorového-operátorového systému, pak se tryptofan odstraní, dojde k derepresi systému a nastane exprese žádaného produktu.

Uvedený postup je podrobněji popsán níže a znázorněn na obrázku č. 6. Plasmid pL 31 (250 µg) se digeruje restriktivním enzymem PstI a gelovou elektroforesou na 6%ním polyakrylamidovém gelu se izoluje vložený fragment o 1000 b.p. Elektroelucí se z gelu získá asi 40 µg žádaného vloženého fragmentu, který se za účelem dalšího zpracování enzymatickou digescí rozdělí na 3 alikvotní podíly:

- a) Asi 16 μg vzorek tohoto fragmentu se částečně digeruje 40 jednotkami endonukleázy BglII po dobu 45 minut při 37 °C a reakční směs se čistí PAGE elektroforesou na 6% 6%ním gelu; získají se asi 2 μg žádaného fragmentu o 670 b.p.
- b) Druhý vzorek (8 μg) Pst fragmentu o 1000 b.p. se štěpí endonukleázami AvaII a BglII; gelovou chromatografií (PAGE) se získá jeden μg uvedeného fragmentu o 150 b.p..
- c) Na 16 μg vloženého fragmentu o 1000 b.p. se působí enzymy Sau3a a AvaII; po izolaci elektroforesou na 10%ním polyakrylamidovém gelu se získá asi 0,25 μg (10 pmol) fragmentu o 34 b.p. Fosfortriesterovou metodou se syntetisují dva dále uvedené deoxyoligonukleotidy, 5'-dAATTCATGTGT (fragment 1) a 5'-dGATCACACATG (fragment 2). Fragment 2 se fosforyluje následujícím způsobem: 200 mikrolitrů (asi 40 pmol) (γ -³²P)-ATP (dodavatel Amersham; aktivita 5000 Ci/mol) se vysuší a znovu nasuspenduje ve 30 mikrolitrech pufru složeného z 60 mM Tris-HCl (pH 8), 10 mM bezvodého chloridu hořečnatého a 15 mM β -merkaptoethanolu, a obsahujícího 100 pmol zmíněného DNA fragmentu a 2 jednotky T4 polynukleotidkinázy. Směs se zahřívá 15 minut na 37 °C; pak se přidá 1 mikrolitr 10 mM roztoku ATP; reakce se nechá probíhat dalších 15 minut při uvedené teplotě a pak se zavede inaktivace zahříváním směsi po dobu 15 minut na 70 °C. K reakční směsi se přidá 100 pmol 5'-OH fragmentu 1 a 10 pmol Sau3a - AvaII fragmentu o 34 b.p. a provede se vzájemné navázání fragmentů v 50 mikrolitrech prostředí složeného z 20 mM Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM bezvodého chloridu hořečnatého; 10 mM dithiothreitolu; 0,5 mM ATP; v přítomnosti 10 jednotek T4 DNA ligázy; při 4 °C po dobu 5 hodin. Směs se rozdělí PAGE elektroforesou na 6%ním gelu a elektroelucí se získá produkt o 45 b.p. Asi 30 ng (1 pmol) posléze zmíněného produktu o 45 b.p. se zkombinuje s 0,5 μg (5 pmol) AvaII - BglII fragmentu o 150 b.p. a 1 μg (2 pmol) BglII - PstI fragmentu o 670 b.p.

Vzájemné navázání se provede působením 20 jednotek T4 DNA ligasy při 20 °C po dobu 16 hodin. Ligasa se inaktivuje zahříváním na 65 °C po dobu 10 minut a směs se za účelem odstranění polymerů genu digeruje enzymy EcoRI a PstI. Po přečištění směsi elektroforesou na 6% PAGE se získá asi 20 ng (0,04 pmol) produktu o 865 b.p. Polovina (10 ng) tohoto produktu se naváže do plasmidu pBR 322 (0,3 μg) mezi jeho EcoRI a PstI štěpná místa. Po transformaci tohoto plasmidu do bakterií E. coli 294 se získá 70 transformantů rezistentních vůči tetracyklinu a citlivých na ampicilin. Plasmidická DNA izolovaná z 18 z těchto transformantů se digeruje enzymy EcoRI a PstI. Z těchto 18 plasmidů obsahovalo 16 EcoRI - PstI fragment o délce 865 b.p. Jeden μg jednoho z těchto fragmentů, pLeIF A1; se digeruje enzymem EcoRI a naváže na shora popsaným způsobem připravený EcoRI fragment o 300 b.p. (0,1 μg), obsahující trp promotor a trp vazebné místo hlavního ribosomu E. coli. Transformanty obsahující trp promotor se identifikují za použití ³²P-trp zkušební vzorku ve spojení se screeningovou metodou pro kolonie bakterií podle Grunsteina-Hogness. Asymetricky umístěné XbaI štěpné místo v trp fragmentu dovoluje stanovení rekombinantů, ve kterých trp promotor je orientovaný ve směru na LeIF A gen.

I. In vitro a in vivo účinnost interferonu LeIF A

Pro stanovení interferonové účinnosti se připraví extrakty následujícím způsobem: Kultury o objemu 1 ml se pěstují na živné půdě L obsahující 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetracyklinu do hodnoty absorbance při 550 nm (A_{550}) asi 1,0; pak se kultura zředí do 25 ml M9 živné půdy obsahující 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetracyklinu. Když A_{550} dosáhne 1,0; odeberou se 10 ml vzorky, které se odstředí, a získané buňky se suspendují v 1 ml roztoku obsahujícím 15 % sacharózy, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) a 50 mM EDTA (kyseliny ethylendiamintetraoctové). K suspenzi se přidá jeden mg lysozymu a po 5 minutách stání při 0 °C se buňky rozruší ultrazvukem. Vzorky se centrifugují 10 minut (15 000 otáček za minutu) a v supernatantu se stanoví interferonová účinnost srovnáním se standardy interferonu LeIF pomocí testu inhibice cytopatické účinnosti (CPE). Ke stanovení počtu molekul interferonu (IF) na jednu buňku se po-

užívá LeIF o specifické aktivitě 4×10^8 jednotek/mg.

Jak je zřejmé z tabulky 1, klon pLeIF A trp 25; ve kterém je trp promotor začleněn v žádané orientaci, dává v tomto testu vysoké hladiny aktivity (ve výši $2,5 \times 10^8$ jednotek v litru). Jak vyplývá z tabulky 2; interferon produkováný bakteriemi E. coli K-12 kmene 294/pLeIF A trp 25 se chová jako autentický lidský interferon LeIF; je stálý vůči kyselému prostředí o pH a a jeho účinnost je neutralizována králičími protilátkami lidských leukocytárních interferonů. Uvedený interferon má zdánlivou molekulovou hmotnost asi 20 000.

Účinnost interferonu in vivo vyžaduje přítomnost makrofágů a přirozených umrtvujících (NK) buněk; přičemž se zdá, že způsob jeho účinnosti in vivo spočívá ve stimulaci těchto buněk. Je proto možné, že interferon produkováný bakteriemi E. coli 294/pLeIF A 25, i když má antivirovou účinnost v testech na buněčných kulturách, by nemusel být účinný u infikovaných živočichů. Kromě toho, in vivo antivirová účinnost bakteriálně produkováného, neglykosylovaného interferonu LeIF A by mohla být rozdílná od glykosylovaného LeIF pocházejícího z lidských leukocytů. Proto biologická účinnost bakteriálně syntetizovaného interferonu LeIF A (o čistotě 2 %) byla srovnávána s účinností interferonu z lidských "kůži pokrytých" leukocytů (LeIF; čistota 8 %) u virové infekce letální encefalomyokarditidy (EMC) hranostajů (viz tabulka 3).

Tabulka 1. Interferonová účinnost extraktů z E. coli

E. coli K-12 kmen 294 transformovaný plasmidem	buněčná hustota (počet buněk na ml)	IF účinnost jednotky/ml kultury	počet LeIF molekul na buňku
pLeIF A trp 25	$3,5 \times 10^8$	36 000	9 000
pLeIF A trp 25	$1,8 \times 10^9$	250 000	12 000

Tabulka 2. Srovnání účinností extraktů z bakterií E. coli 294/pLeIF A 25 se standardním interferonem LeIF *

Extrakt	Interferonová účinnost (jednotky/ml)		
	bez úpravy	při pH 2	v přítomnosti králičích anti-lidských leukocytárních protilátek
extrakt z E. coli 294/pLeIF A trp 25	500	500	<10
LeIF standard	500	500	<10

x/ Extrakt z bakterií E. coli 294/pLeIF A trp 25 o interferonové aktivitě 250 000 jednotek na ml; popsáný v tabulce 1; byl zředěn 500krát minimální základní živnou půdou na specifickou aktivitu 500 jednotek/ml.

Standard leukocytárního interferonu (z Wadleyova ústavu), předem otitrovaný vůči NIH leukocytárnímu interferonovému standardu, byl rovněž zředěn na konečnou koncentraci 500 U/ml. Alikvotní podíly o objemu 1 ml byly upraveny kyselinou chlorovodíkovou o koncentraci 1N na pH 2; vzorky inkubovány 52 hodin při 4 °C; zneutralizovány přidáním roztoku hydroxidu draselného a stanovena IF aktivita pomocí standardního testu CPE inhibice. Jiné alikvotní podíly o objemu 25 mikrolitrů ze vzorků o koncentraci 500 jednotek/ml (ni-

jak neošetřené) byly inkubovány s 25 mikrolitry králičí protilátky lidského leukocytárního interferonu při 37 °C po dobu 60 minut; vzorky byly 5 minut centrifugovány při 12 000 násobku g a supernatant testován.

Tabulka 3. Antivirová účinnost různých LeIF preparátů vůči EMC virové infekci hranostajů

Ošetření interferonem	Přežití	Jednotky tvoření serových destiček/ml		
		den 2	den 3	den 4
Kontrola (bakteriální bílkoviny)	0/3	10 0 0 } 3	3×10^4 0 0 } 10^4	10^5 1200 0 } $3,4 \times 10^4$
Bakteriální LeIF A	3/3	0 0 0	0 0 0	0 0 0
Standardní LeIF	3/3	0 0 0	0 0 0	0 0 0

K testování byli použiti samci hranostajů o průměrné hmotnosti 713 g, kteří neměli před infikováním protilátky vůči EMC viru. Zvířata byla infikována intramuskulárně dávkou $100 \times LD_{50}$ EMC viru (zjištěno u myši). V kontrolní skupině uhynuli hranostajové za 134; 158 a 164 hodin po infikování. Ošetření zvířat interferonem v dávce 10^6 jednotek bylo prováděno intravenózní cestou v intervalech -4, +2; 23, 29, 48; 72; 168 a 240 hodin, vztaženo na dobu, kdy bylo provedeno infikování. Použitý bakteriální leukocytární interferon byla frakce ze sloupcové chromatografie lysátu bakterií *E. coli* 294/pLeIF A 25 o specifické aktivitě $7,4 \times 10^6$ jednotek/mg bílkoviny. Jako kontrolních bakteriálních bílkovin bylo použito bílkovin z ekvivalentní frakce sloupcové chromatografie lysátu bakterií *E. coli* 294 pBR 322 o dvojnásobné koncentraci celkových bílkovin. Jako standardního leukocytárního interferonu bylo použito interferonu indukovaného Sendaiským virem z normálních lidských buněk; přečištěný chromatograficky do specifické aktivity 32×10^6 jednotek na mg bílkoviny.

Hranostajové v kontrolní skupině vykazovali postupující lethargii; ztrátu rovnováhy, ochablost a ochrnutí zadních končetin a zalévání očí začínající asi 8 hodin před smrtí. Interferonem ošetření hranostajové nevykazovali žádnou z těchto abnormalit; zůstávali po celý čas aktivní a nevyvinula se u nich virémie. Jeden hranostaj z kontrolní skupiny, u kterého se nevyvinula virémie během 4 dnů; uhynul nejpozději z neléčených zvířat (za 164 hodin po infikování); ale vykázal vysoké titry viru v srdci a v mozku post mortem. U hranostajů ošetřených interferonem se nevytvořily protilátky proti EMC viru, jak bylo stanoveno za 14 a za 21 dnů po infikování. Tyto výsledky ukazují, že antivirální účinnost LeIF preparátů u infikovaných zvířat lze přisoudit pouze interferonu, poněvadž kontaminující bílkoviny v bakteriálních preparátech a v preparátech z lidských leukocytů jsou zcela rozličné. Tyto výsledky dále naznačují, že glykosylace není pro *in vivo* antivirovou účinnost interferonu LeIF A potřebná.

J. Izolace dalších cDNA pro ostatní leukocytární interferony

Z plně charakterizovaného plasmidu obsahujícího interferonovou LeIF A cDNA se vyřízne DNA enzymem PstI; izoluje pomocí elektroforézy a označí radioaktivním ^{32}P . Získa-

ná radioaktivně značená DNA se použije jako zkušební vzorek k výběrovému třídění dalších transformantů bakterií *E. coli* 294, získaných stejným postupem jak bylo popsáno v části C; pomocí metody skríníngu kolonií *in situ* podle Grunsteina a Hognesse (viz výše); Izolují se kolonie, které hybridizují v rozličných množstvích se zkušebním vzorkem. Štěpením těchto kolonií a deseti hybridizujících kolonií popsanych v části G pomocí enzymu PstI bylo izolována plasmidická DNA, která byla charakterizována třemi rozdílnými metodami. Zmíněné PstI fragmenty byly nejprve charakterizovány na základě vzorků získaných digescí restrikčními endonukleázami, enzymy Bgl II, Pvu II a Eco RI. Tato analýza umožnila charakterizovat nejméně osm rozličných typů (LeIF A, LeIF B, LeIF C, LeIF D, LeIF E, LeIF F; LeIF G a LeIF H), znázorněných na obrázku 5, na kterém je přibližně uvedeno umístění různých restrikčních míst ve vztahu k současné znalosti o presekvenční a kódující sekvenci LeIF A. Jeden z těchto fragmentů, LeIF D, je pravděpodobně identický s DNA fragmentem popsáným Nagatou a spolupracovníky v časopisu *Nature* 284, 316-320 (1980).

Za druhé byly některé ze zmíněných DNA testovány pomocí hybridizačních selekčních testů popsanych Glevelandem a spolupracovníky v časopisu *Cell* 20, 95-105 (1980), na základě schopnosti selektivně odstraňovat LeIF mRNA z KG-1 buněčné RNA obsahující poly-A řetězce. V tomto testu byly LeIF A, B, C a F pozitivní. Za třetí, posledně zmíněné Pst fragmenty byly včleněny do exprese schopného plasmidu, zmíněným plasmidem byly transformovány bakterie *E. coli* 294 a fragmenty byly exprimovány. Všechny produkty zmíněné exprese, o kterých se předpokládalo, že to jsou pre-interferony, byly pozitivní v CPE testu na interferonovou aktivitu, ačkoliv v případě LeIF F fragmentu byla nalezena jen okrajová účinnost. Kromě shora uvedeného charakterisování byla u všech popsanych LeIF typů stanovena sekvence.

K. Přímá exprese druhého zralého leukocytárního interferonu (LeIF B)

Bylo zjištěno, že sekvence prvních čtrnácti nukleotidů izolovaného fragmentu obsahujícího gen pro zralý interferon LeIF B je stejná u typů A i B. Z plasmidu pLeIF A 25 byl proto izolován fragment nesoucí trp promotor-operátor, ribosomové vazebné místo a iniciační signál pro LeIF A (=B) gen, a tento fragment byl zkombinován se zbývajícím částí B-sekvence za vzniku exprese schopného plasmidu. Mapy vyčnívajících restrikčních míst Pst fragmentu plasmidu pL4 (plasmid obsahující interferonový LeIF B gen zakončený Pst zbytky, znázorněný na obrázku 5); a plasmidu pLeIF A 25 jsou uvedeny na obrázcích 7a a 7b.

Aby se ze sekvence znázorněné na obrázku 7a získal Sau3a až PstI fragment obsahující přibližně 950 b.p., je třeba provést několik operací vzhledem k tomu, že je přítomno jedno nebo více intervenujících Sau 3a restrikčních míst; to je:

1. Po provedení štěpení se izolují následující fragmenty:
 - a) fragment od Sau3a štěpícího místa po EcoRI místo obsahující 110 b.p.;
 - b) fragment od EcoRI místa k Iba místu obsahující 132 b.p.;
 - c) fragment od Xba místa k Pst místu obsahující více než 700 b.p.
2. Fragmenty 1a) a 1b) se vzájemně naváží a koncové skupiny Sau 3a a Xba se odříznou působením enzymů Xba a BglII, aby se zabránilo samopolymeraci způsobené těmito terminály (relevantní Sau 3a místo je uvnitř BglII místa; enzymem BglII se štěpí, aby se odříznul Sau 3a zachytýný konec). Izoluje se fragment obsahující 242 b.p.
3. Produkty získané postupy 2) a 1c) se navzájem naváží a za účelem zabránění samovolné polymerizace se koncové skupiny odříznou působením enzymů PstI a BglII. Izoluje se fragment od Sau3a až k PstI místu obsahující asi 950 b.p., znázorněný na obrázku 7a. Tento fragment obsahuje tu část LeIF B genu, která není společná s LeIF A.
4. Z plasmidu pLeIF A 25 se izoluje fragment obsahující přibližně 300 b.p. (od HindIII k Sau3a), obsahující trp promotor-operátor, ribosomové vazebné místo, STG startovací signál a cysteinový kodon pro LeIF A.

5. Z plasmidu pBR 322 se izoluje fragment od *Pst*I k *Hind*III obsahující přibližně 3600 b.p.; tento fragment obsahuje replikon a zakódovanou tetracyklinovou, ale nikoliv ampicilinovou rezistenci.

6. Fragmenty získané ve stupních 3, 4 a 5 se navzájem trojitě naváží a získaný plasmid se transformuje do bakterií *E. coli* K-12 kmene 294.

Provede se minimální vyhledávací třídění transformantů /postupem podle Birnboima a spolupracovníků, *Nucleic Acids Res.* 7, 1513-1523 (1979)/ a vzorky plasmidů se digerují endonukleasou *Eco*RI. Digesti se získají tři fragmenty, které byly identifikovány jako 1) fragment obsahující *Eco*RI-*Eco*RI *trp* promotor; 2) vnitřní *Eco*RI až *Eco*RI fragment plasmidu pL4, a 3) fragment plasmidu pL4 obsahující iniciační signál pro translaci bílkoviny až *Eco*RI.

Bakteriální extrakty z klonů připravených shora uvedeným způsobem vykazaly v CPE testu typickou hodnotu asi 10×10^6 jednotek interferonové aktivity na litr při $A_{550} = 1$. Jeden reprezentační klon připravený tímto postupem byl označen jako *E. coli* 294/pLeIF B *trp* 7.

L. Přímá exprese dalších zralých leukocytárních interferonů (LeIF C; D, F; H; I a J)

Stejně jako v případě LeIF A lze sestavit i další genové fragmenty o plné délce, obsahující jiné typy interferonů LeIF; a lze je umístit do exprimačních nosičů určených pro jejich expresi. Pomocí úplného stanovení sekvence obvyklými způsoby se zjistí, které restrikční místo leží dostatečně blízko prvního aminokyselinového kodonu zralého interferonového typu, aby umožnilo aplikovat postup popsáný ve shora uvedené části H pro expresi zralého interferonu LeIF A, to je eliminaci presekvence restrikčním odříznutím a nahrazení kodonů pro N-terminální aminokyseliny ztracených eliminací presekvence navázáním synthetického DNA fragmentu. Selže-li tento způsob, lze použít následujícího postupu, který, ve stručnosti, spočívá ve štěpení fragmentu obsahujícího presekvenci přesně před bodem, ve kterém začíná kodon pro první aminokyselinu zralého polypeptidu. Postupuje se tak; že se

1. Dvouvláknová DNA převede v oblasti obklopující tento bod na jednovláknovou DNA;
2. Na jednovláknovou oblast vytvořenou podle bodu 1) se hybridizuje komplementární délka primeru jednovláknové DNA, přičemž 5' konec primeru leží na opačné straně nukleotidu sousedícího se zamýšleným štěpícím místem;
3. Ta část druhého vlákna odstraněná ve stupni 1), která leží v 3' směru od primeru, se obnoví reakcí s DNA polymerásou v přítomnosti trifosfátů deoxynukleotidů obsahujících adenin, thymin, guanin a cytosin;
4. Zbývající délka jednovláknové DNA, která vyčnívá nad zamýšlené místo štěpení, se odstraní digestí.

Poté lze navázat na 3' konec kodujícího vlákna jako jeho zakončení krátký řetězec synthetické DNA s iniciačním signálem ATG pro translaci, například tak, že se pomocí "lepivých" konců naváže na sestrojený gen pro zralý interferon, a takto získaný gen se včlení do plasmidu schopného exprese a uvede pod kontrolu promotoru a jeho přidruženého ribosomového vazebného místa.

Podobným způsobem, jaký byl popsán výše v části K, se příslušně pro přímou bakteriální expresi uspořádají genové fragmenty kódující interferony LeIF C a LeIF D. Strategie exprese pro tyto další leukocytární interferony zahrnuje v každém případě použití fragmentu přibližně o 300 b.p. (*Hind*III až *Sau*3a); obsahujícího *trp* promotor-operátor, ribosomové vazebné místo, ATG iniciační signál a cysteinový kodon interferonu LeIF A z plasmidu pLeIF A 25. S tímto fragmentem se zkombinují genové fragmenty z dalších interferonových genů kódující jejich příslušné aminokyselinové sekvence mimo počátečního cystei-

nu, který je společný všem. Každý takto vzniklý plasmid se použije k transformaci bakterií *E. coli* K-12, kmene 294. K sestrojení příslušných genů se použije následujících ligací.

Interferon LeIF C

Z plasmidu pLeIF C se izolují následující fragmenty:

- a) fragment od Sau 3a k Sau 96 o 35 b.p.;
- b) fragment od Sau 96 k PstI o více než 900 b.p.

Z plasmidu pLeIF A-25 se izoluje postupem popsaným výše v části K 4)

- c) fragment HindIII až Sau 3a o 300 b.p.;

Z plasmidu pBR 322 se izoluje způsobem popsaným výše v části K 5)

- d) fragment PstI až HindIII o přibližně 3600 b.p.

Sestrojení genu

1. Naváží se fragmenty a) a c), produkt se štěpí enzymy Bgl II a Hind III a izoluje se fragment asi o 335 b.p.
2. Proveďte se trojitá ligace fragmentů 1) + b) + d) a resultujícím plasmidem se transformují bakterie *E. coli*.

Typický klon získaný tímto způsobem byl označen jako *E. coli* K-12 kmen 294/pLeIF C trp 35.

Interferon LeIF D

Z plasmidu pLeIF D se izolují následující fragmenty:

- a) fragment Sau3a až Ava II o 35 b.p.;
- b) fragment od Ava II k BglII o 150 b.p.;
- c) fragment od BglII k PstI o přibližně 700 b.p.

Z plasmidu pLeIF A25 se izoluje

- d) fragment od HindIII až po Sau3a o 300 b.p.

Z plasmidu se izoluje

- e) fragment od HindIII k PstI o přibližně 3600 b.p.

Sestrojení genu

1. Naváží se fragmenty a) + b); produkt se vyřízne enzymem BglII a po přečištění se získá produkt o 185 b.p. (1).
2. Proveďte se navázání fragmentů 1) + d) vyřízne se enzymy HindIII a BglII a vyčistí se produkt o přibližně 500 b.p. (2).
3. Proveďte se navázání fragmentů 2) + c) + e) a získaným plasmidem se transformují bakterie *E. coli*.

Typický klon připravený tímto způsobem byl označen jako *E. coli* K-12 kmen 294/pLeIF D trp 11.

Interferon LeIF F

Fragment obsahující LeIF F lze pro přímou expresi sestrojít tak, že se k rekonstrukci s výhodou použije aminokyselinové sekvence 1 až 13 interferonu LeIF B, která je úplně shodná s obdobnou sekvencí interferonu LeIF F. Z plasmidu pHG 207, popsaného výše, se postupem za použití restrikčních enzymů Pst I a Xba I digescí a následující izolací připraví fragment asi o 1050 b.p. (a), obsahující trp promotor a mající žádanou konfiguraci na svých koncích. Druhý fragment (b) se izoluje jako větší fragment ze směsi získané digescí plasmidu pHKY 10 endonukleázami PstI a BglII. Fragment a) obsahuje přibližně polovinu genu kódujícího ampicilinovou rezistenci; fragment b) obsahuje zbytek tohoto genu a celý gen pro tetracyklinovou rezistenci, kromě připojeného promotoru. Fragmenty a) a

jeden z uvedených klonů, HLeIF 2, pro další analysování.

Za použití shora popsané metody lze s výhodou použít jiných zkušebních vzorků k izolování dalších leukocytárních interferonových bílkovin podle tohoto vynálezu.

Sestrojení genu pro interferon LeIF I:

1. EcoRI fragment klonu λ HLeIF 2 o 2000 b.p. se subklonuje do plasmidu pBR 325 v jeho restrikčním místě. Získaný plasmid obsahující LeIF I se štěpí enzymem EcoRI a izoluje se fragment o 2000 b.p. Na tento EcoRI fragment o 2000 b.p. se naváže deoxyoligonukleotid dAATTCTGCAG (konvertor EcoRI - PstI), vzniklý produkt se rozštěpí enzymem PstI a získá se fragment o 2000 b.p. obsahující PstI konce. Tento fragment se rozštěpí enzymem Sau96 a izoluje se fragment o 1100 b.p., který má jeden PstI a jeden Sau96 konec.
2. Plasmid pLeIF C trp 35 se digeruje enzymy PstI a XbaI a izoluje se větší fragment.
3. Malý XbaI - PstI fragment z plasmidu pLeIF C trp 35 se digeruje enzymy XbaI a Sau96 a izoluje se XbaI - Sau96 fragment o 40 b.p.
4. Proveďte se ligace fragmentů izolovaných ve stupních 1), 2) a 3) a tak se vytvoří exprese schopný plasmid pLeIF I trp 1.

Interferon LeIF J

Postup k sestrojení plasmidu schopného exprese LeIF J:

1. Plasmid pLeIF J obsahuje HindIII fragment o 3,8 kilobasích lidské genomové DNA, který zahrnuje LeIF J genovou sekvenci. Z tohoto plasmidu se izoluje DdeI - RsaI fragment o 760 b.p.
2. Plasmid pLeIF B trp 7 se rozštěpí enzymy HindIII a DdeI a izoluje se HindIII - DdeI fragment o 340 b.p.
3. Plasmid pBR 322 se rozštěpí enzymem PstI; fragmenty se zakončí lepivými konci inkubací s DNA polymerasou I (Klenowův fragment) a provede se digesce enzymem HindIII. Izoluje se velký fragment přibližně o 3600 b.p.
4. Proveďte se ligace fragmentů izolovaných ve stupních 1), 2) a 3) a tak se sestojí exprese schopný plasmid pLeIF J trp 1.

M. Čištění

Obsah leukocytárního interferonu v bakteriálních extraktech lze zvýšit postupným čištěním:

1. Polyethyleniminovým srážením; při kterém většina buněčných bílkovin, včetně interferonu, zůstává v supernatantu.
2. Amoniumsulfátovou frakcionací, při které interferon vypadává z 55%ního nasyceného roztoku síranu amonného.
3. Suspendováním amoniumsulfátových pelet v pufru složeném z 0,06 M fosforečnanu draselného a 10 mM Tris-HCl, pH 7,2, a dialysou proti 25 mM Tris-HCl, pH 7,9 (interferonová aktivita zůstává v roztoku).
4. Chromatografií shora uvedeným způsobem získaného supernatantu, při pH upraveném na 8,5, na sloupci DEAE celulosy (lineární gradientová eluce s 0 až 0,2 M roztokem chloridu sodného ve 25 mM Tris-HCl, pH 8,5).
5. Adsorpcí na agarose (značky Cibachrome Blue Agarose) nebo na hydroxyapatitu a elucí 1,5 M roztokem chloridu draselného, popřípadě 0,2 M roztokem fosforečnanu.
6. Molekulárním tříděním na koloně Sephadex ^R G-75.

7. Katexovou chromatografií na CM-celulose ve 25 mM roztoku octanu amonného při pH 5,0, eluce amoniumacetátovým gradientem (až na 0,2 M roztok octanu amonného).

Shora uvedenými čistícími postupy se získá materiál o čistotě vyšší než 95 %.

Surový materiál lze rovněž čistit chromatografickým tříděním podle velikosti molekuly, vysokotlakou kapalinovou chromatografií s reversní fází (RP-8) nebo afinitní chromatografií na imobilisovaných antiinterferonových protilátkách.

Alternativně lze materiál získaný ve shora uvedeném stupni 4 nanést na sloupec obsahující monoklonální protilátku, připravený způsobem popsáným Milsteinem v časopisu *Scientific American* 243, 66 (1980), a interferon eluovat směsí 0,2 M kyseliny octové, 0,1% roztoku Tritonu a 0,15 M roztoku chloridu sodného.

Při alternativním výhodném provedení lze leukocytární interferon vyprodukovaný shora popsáným způsobem čistit pomocí následujících čistících operací:

1. Zmražené buněčné pelety obsahující exprimovaný leukocytární interferon se rozbíjí buď manuálně nebo ve vhodném drticím zařízení. Částečně rozmrazené buňky se suspendují ve 4 objemech pufru A; obsahujícího 0,1 M roztok Tris-base upravený na pH 7,5 až 8,0 10% (m/V) roztok sacharosy, 0,2 M roztok chloridu sodného, 5 mM roztok EDTA, 0,1 mM roztok PMSF a 10 až 100 mM roztok bezvodého chloridu hořečnatého. Suspenze se udržuje na teplotě asi 4 °C.

Suspenze se pak nechá projít homogenizátorem při asi 41,4 MPa a pak znovu při tlaku menším než 6,9 MPa. Efluent z homogenizátoru z obou pasáží se jímá za chlazení ledovou lázní.
2. K homogenátu se pomalu přidává polyethylenimin až do koncentrace asi 0,35 % a směs se ponechá stát asi 30 minut. Pevné podíly se oddělí odstředěním nebo filtrací. Tento stupeň se provádí za stálého kontrolování teploty nebo dostatečně rychle, tak aby teplota supernatantu (nebo filtrátu) byla stále nižší než 10 °C. Supernatant (filtrát) se zkoncentruje ultrafiltrací přibližně na 1/10 původního objemu. Drobné částičky nebo zákal v zadržném zahuštěném roztoku lze odstranit filtrací přes vhodný filtr, jako například přes mikroporesní membránu.
3. Vyčištěný roztok se nanese přímo na sloupec obsahující monoklonální protilátku, při rychlosti toku 5 až 8 cm/hod. (Například 25 až 40 ml/hod. na sloupci o průměru 2,6 cm). Po nanesení roztoku se sloupec promyje přibližně desetinásobkem objemu sloupce roztoku 25 mM Tris-HCl o pH 7,5 až 8,5; obsahujícího 0,5 M roztok chloridu sodného a roztok povrchově aktivní látky, jako 0,2% roztok Tritonu X-100 nebo ekvivalentní látky. Po promytí se sloupec vypláchne desetinásobkem objemu sloupce roztoku obsahujícího 0,15 M chlorid sodný a povrchově aktivní činidlo jako Triton X-100 (0,1% roztok) nebo jeho ekvivalent. Pak se sloupec eluuje 0,2 M roztokem kyseliny octové obsahujícím povrchově aktivní látku jako Triton X-100 (0,1% roztok) nebo jeho ekvivalent. Bílkovinová frakce ze sloupce s monoklonální protilátkou (stanovená pomocí UV absorpce nebo jinou vhodnou analytickou metodou) se shromáždí a pH se upraví LN roztokem hydroxidu sodného nebo 1,0 M roztokem Tris-base na hodnotu přibližně 4,5.
4. Spojené interferonové frakce se nanesou na sloupec katexu, jako na sloupec celulosy CM 52 (značky Whatman) nebo její ekvivalent, která byla předtím ekvilibrována vhodným pufrem, jako 50 mM roztokem octanu amonného o pH 4,5. Po nanesení interferonu se sloupec promývá pufrem použitým k ekvilibraci tak dlouho, až UV absorpce eluentu dosáhne takové hladiny, že se ze sloupce eluuje trochu žádané bílkoviny. Sloupec se pak eluuje roztokem 25 mM octanu sodného obsahujícího 0,12 M chloridu sodného nebo jinou kombinací, která optimalizuje získání interferonu a poskytne po lyofilizaci produkt mající vyhovující vlastnosti jako vzhled a rozpustnost.

Monoklonální protilátky používané při výhodném provádění čištění podle vynálezu popsaném výše lze připravit postupy popsányými Staehelinem a spolupracovníky v časopisu *Proc.*

Natl. Acad. Sci. USA 78; 1848-1852 (1981). Monoklonální protilátky připravené z ascitické tekutiny se vyčistí a kovalentně naváží na Affigel-10 způsobem popsaným níže:

Každá z pěti myších samic druhu Balb/c se naočkuje 5 až 10 x 10⁶ hybridních buněk ze střední růstové fáze kmene. Asi 5 x 10⁶ životaschopných buněk získaných z myši produkční kapaliny se inokuluje intraperitoneálně další skupině deseti nebo více myši. Od každé myši z posléze uvedené skupiny se opakovaně (2x až 4x) odebírá ascitická kapalina. Mohou být provedeny až tři přenosy buněk a následující odebrání ascitické kapaliny z jedné skupiny myši na druhou. Ascitická kapalina odebraná myším při každém přenosu buněk se shromažďuje.

Z ascitické kapaliny se odstraní buňky a jejich zbytky odstředěním při nízkých otáčkách (500 až 1000 násobek g) po dobu 15 minut. Pak se pokračuje v odstřeďování při 18 000 otáčkách za minutu po dobu 90 minut. Supernatant se zmrazí a uloží při teplotě -20 °C. Po rozmrazení se odstraní další fibrin a jemný vyloučený materiál odstřeďováním při 35 000 otáčkách za minutu po dobu 90 minut. Všechny šarže ascitické kapaliny z každého transforu se testují na specifickou protilátkovou aktivitu stanovením protilátkové vazby v pevné fázi /viz Staehelin a spolupracovníci, citace uvedená výše/ a vyhovující podíly se spojují.

Koncentrace bílkoviny ve spojených roztocích se stanoví aproximačně na základě toho, že 1 mg bílkoviny vykazuje při 280 nm absorpenci 1,2 v kyvetě o tloušťce 1,0 cm. Ascitické kapaliny s vysokými hladinami protilátky obsahují 30 až 35 mg bílkoviny v jednom ml. Toto množství je ekvivalentní 4 až 7 mg specifické protilátky/ml. Ascitická kapalina o této koncentraci se ředí PBS roztokem (roztok 0,01 M fosforečnanu sodného o pH 7,3 a 0,15 M chloridu sodného) na koncentraci 10 až 12 mg bílkoviny v ml.

Ke každým 100 ml takto zředěného roztoku se při 0 °C, za intenzivního míchání, pomalu přidá 90 ml při teplotě místnosti nasyceného roztoku síranu amonného. Suspense se chladí ledem po dobu 40 až 60 minut a pak se odstřeďuje 15 minut při teplotě 4 °C při 10 000 otáčkách za minutu. Supernatant se oddekantuje a odcentrifugovaná látka se dobře vysuší. Pelety bílkoviny se rozpustí v roztoku obsahujícím 0,02 M Tris-HCl (pH 7,9) a 0,04 M chlorid sodný (pufr I). Roztok bílkoviny se dialysuje 16 až 18 hodin při teplotě místnosti proti 100 objemům zmíněného pufru I s minimálně jednou výměnou pufru. Dialysovaný roztok se za účelem odstranění nerozpustného materiálu odstřeďuje 10 minut při 15 000 otáčkách za minutu. Podle stanovení absorpce při 280 nm se získá 30 až 35 % původního množství celkové bílkoviny přítomné v ascitické kapalině.

Roztok obsahující 30 až 40 mg bílkoviny na ml se poté nanese na sloupec DEAE-celulose, ekvilibrované předem pufr I. Na každý gram nanesené bílkoviny se použije vrstva sloupce o objemu alespoň 100 ml. Protilátka se ze sloupce vymývá gradientovou elucí roztokem chloridu sodného obsahujícím 0,02 M Tris-HCl o pH 7,9, s lineárním gradientem od 0,04 M do 0,5 M chloridu sodného. Spojené frakce bílkoviny eluované roztokem o koncentraci mezi 0,06 až 0,1 M chloridu sodného se zkoncentrují tím způsobem, že se bílkovina vysráží stejným objemem roztoku síranu amonného nasyceného při teplotě místnosti a produkt se odcentrifuguje. Získané pelety bílkoviny se rozpustí v roztoku obsahujícím 0,2 M hydrogenuhličitan sodný (pH asi 8,0) a 0,3 M chlorid sodný (pufr II) a roztok se dialysuje při teplotě místnosti proti stejnému pufru, který se třikrát vymění. Dialysovaný roztok se za účelem odstranění malého množství nerozpustného materiálu odstřeďuje 15 minut při 20 000 násobku g, a koncentrace bílkoviny se upraví pufr II na hodnotu 20 až 25 mg/ml. Uvedeného roztoku protilátky se použije k přípravě imunoadsorbentu následujícím způsobem.

Affigel-10 (dodavatel BioRad Laboratories, Richmond, Kalifornie) se promyje na sintrovaném skleněném filtru třikrát ledem ochlazeným isopropanolem a pak třikrát ledovou destilovanou vodou. Kaše gelu (asi 50%ní v ledové vodě) se přenese do trubice z plastické hmoty a provede se sedimentace adsorbentu krátkým odstředěním; supernatant se odsaje. Do

trubice naplněné gelem se přidá stejný objem (vzhledem ke gelu) přečištěného roztoku protilátky a trubice se nechá za účelem promíchání obsahu otáčet kolem kolmé osy 5 hodin při 4 °C. Po skončení reakce se gel odstředí a promyje dvakrát pufrem III (roztok 0,1 M hydrogenuhličitanu sodného a 0,15 M chloridu sodného), aby se odstranila nezkopu-
lovaná protilátka. Stanovení bílkovin ve spojených promývacích roztocích ukázalo, že více než 90 % protilátky se navázalo na gel.

Aby se zablokovala nezreagovaná místa, smísí se takto upravený gel se stejným obje-
mem 0,1 M roztoku hydrochloridu ethanolaminu (pH 8) a trubice se nechá znovu za účelem
promíchání obsahu rotovat 60 minut při teplotě místnosti. Kaše gelu se promyje až do
odstranění reaktantů roztokem PBS a přechovává se v roztoku PBS v přítomnosti 0,02 %
(m/v) azidu sodného při teplotě 4 °C.

N. Parenterální podávání interferonů

Interferonový LeIF lze podávat parenterálně osobám potřebujícím antitumorové nebo
antivirové léčení a těm, u kterých se projevují imunosupresivní stavy. Dávkování a počet
dávek jsou paralelní s těmi, které se běžně používají při klinickém zkoušení interferonů
získaných z lidských zdrojů, například asi $(1 \text{ až } 10) \times 10^6$ jednotek denně, a v případě
materiálů o vyšší čistotě než 1 %, účelně až do této čistoty, například 5×10^7 jednotek
denně.

Jako jeden příklad vhodné aplikační formy pro v podstatě homogenní bakteriální inter-
feron LeIF lze uvést přípravu parenterální formy: 3 mg LeIF o specifické aktivitě napří-
klad 2×10^8 jednotek/mg se rozpustí ve 25 ml 5N roztoku lidského serumalbuminu; roztok
se zfiltruje přes bakteriologický filtr a zfiltrovaný roztok se asepticky rozdělí do
100 kusů injekčních ampulek, které pak obsahují po 6×10^6 jednotek čistého interferonu
vhodného pro parenterální podávání. Ampulky se před použitím výhodně přechovávají v chla-
du (při -20 °C).

Sloučeniny podle předloženého vynálezu lze formulovat známými metodami do formy far-
maceuticky vhodných přípravků, přičemž účinný polypeptid se používá ve směsi s farmaceu-
ticky přijatelným nosným vehikulem. Vhodná vehikula a jejich formulování jsou popsány na-
příklad v příručce "Remington's Pharmaceutical Sciences" E.V. Martinem, na kterou zde od-
kazujeme. Farmaceutické přípravky podle vynálezu obsahují účinné množství interferonové
bílkoviny spolu s vhodným množstvím vehikula umožňujícího účinné podávání preparátu hos-
titeli. Jeden z přednostních způsobů podávání je parenterální podávání.

P R Ě D M Ě T V Y N Ā L E Z U

1. Způsob výroby E.coli buněk schopných produkovat zralý lidský leukocytární inter-
feron LeIF A, B, C, D, F, H, I nebo J s aminokyselinovou sekvencí od polohy 1 až 166 jak
je uvedeno na obr. 4 a 9, vyznačující se tím, že

- a) inkubují se E.coli buňky ošetřené chloridem vápenatým DNA expresním vektorem vybraným
ze skupiny zahrnující plasmid pLeIF A trp 25 DNA, plasmid pLeIF B trp 7 DNA, plasmid
pLeIF C trp 35 DNA, plasmid pLeIF D trp 11 DNA, plasmid pLeIF F trp 1 DNA, plasmid
pLeIF H DNA, plasmid pLeIF I trp 1 DNA a plasmid pLeIF J trp 1 DNA v ligačním ústo-
jném roztoku po dobu 30 minut a
- b) provede se selekce transformovaných E.coli buněk na tuhé vrstvě agaru obsahující tetra-
cyklin.

2. Způsob podle bodu 1 pro výrobu E.coli buněk schopných produkovat zralý lidský leu-
kocytární interferon LeIF A s aminokyselinovou sekvencí od polohy 1 až 166 jak je uvedeno
na obr. 4, vyznačující se tím, že se inkubují E.coli buňky plasmidem pLeIF A trp 25 DNA.

3. Způsob podle bodu 1 pro výrobu E.coli buněk schopných produkovat zralý lidský leukocytární interferon LeIF B, C, D nebo F s aminokyselinovou sekvencí od polohy 1 až 166 jak je uvedeno na obr. 4, vyznačující se tím, že se inkubují E.coli buňky DNA expresním vektorem vybraným ze skupiny zahrnující plasmid pLeIF B trp 7 DNA, plasmid pLeIF C trp 35 DNA, plasmid pLeIF D trp 11 DNA a plasmid pLeIF trp 1 DNA.

4. Způsob podle bodu 1 pro výrobu E.coli buněk schopných produkovat zralý lidský leukocytární interferon LeIF H s aminokyselinovou sekvencí od polohy 1 až 166 jak je uvedeno na obr. 4, vyznačující se tím, že se inkubují E.coli buňky plasmidem pLeIF H DNA.

5. Způsob podle bodu 1 pro výrobu E.coli buněk schopných produkovat zralý lidský leukocytární interferon LeIF I nebo J s aminokyselinovou sekvencí jak je uvedeno na obr. 9, vyznačující se tím, že se inkubují E.coli buňky plasmidem pLeIF I trp 1 DNA nebo plasmidem pLeIF J trp 1 DNA.

6. Způsob podle bodu 1, vyznačující se tím, že se jako E.coli kmen používá E.coli K-12 kmen 294 (ATCC 31446).

TRYPTICKÝ PEPTID (T-1) TRYPTICKÝ PEPTID (T-13)

Ala-Glu-Ile-Met-Arg ---His-Glu-Met-Ile-Gln---

BÍLKOVINA

mRNA

5' GCN GAG^A AUC^A AUG^A C^{AGN}

5' CA^C_U GA^A_G AUG^A AUC^A CA^A_G

KOMPLEMENTÁRNÍ
DNA PRIMERY

CTT TAG^A TAC GC (T-1A)

3' GTA CTT TAC TA (T-13A)
---G--- (T-13B)
---C--- (T-13C)
---G--- (T-13D)

---C--- (T-1B)
---T--- (T-1C)
---C--- (T-1D)

OBR.1

CS 273 181 B2

$^{32}\text{P-T-1C}$ ZKUŠEBNÍ VZOREK

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25

26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

$^{32}\text{P-T-13C}$ ZKUŠEBNÍ VZOREK

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39

OBR.2

-60 -40 -20 +1 20 40
 LeIF A TGAGCCTAAACCTTAGGCTCACCCATTTCACACGAGCTAGCAGCATCTGCAACATCTACAATGGCCCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGC
 LeIF B TACTAGCTCAGCAGCATCCGCAACATCTACAATGGCCCTTGACCTTTGCTTTAAATGGTGGCCCTAGTGGTGC
 LeIF C CAAAGGTTATCCATCTCAAGTAGCCTAGCAATATTTGCAACATCCCAATGGCCCTTGCTTTTCTTACTATGATGGTCCCTGGTGGTGC
 LeIF D CAAAGGTTACAGAGTCACCCCATCTCAGCAAGCCAGAAATATCTGCAATATCTACGATGGCCCTCGCCCTTGCTTTACTGATGGTCCCTGGTGGTGC
 LeIF E ACATCCCAATGGCCCTGTCTTTCTTTACTGATGGCCCTGTCTGGTGC
 LeIF F CCAAGGTTACAGTGTACCCCTCATCAACCAAGCCAGCAGCATCTTCGGGATTCCCAATGGCATTGCCCCCTTTGCTTTATGATGGCCCTGGTGGTGC
 LeIF G
 LeIF H
 60 80 100 120 140
 LeIF A TCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCTTCAAAACCCACAGCCTGGGTAGCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAGATGAGGAGAAAT
 LeIF B TCAGCTACAAGTCATTCAGCTCTCTGGGCTGTGATCTGCTCAGACTCACAGCTGGGTAAACAGGAGGGCCCTTGATACTCCTGGCACAAATGCGAAGAAAT
 LeIF C TCAGCTACAAGTCCATCTGTTCTCTGGGCTGTGATCTGCTCAGACCCACAGCCTGGTAAATAGGAGGGCCCTTGATACTCCTGGCACAAATGGGAGAAAT
 LeIF D TCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCTGAGACCCACAGCCTGGATAAACAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCACAAATGAGCAGAAAT
 LeIF E CTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCTCAGGCCCCACAGCCTGGGTAAACAGGAGGGCCCTTGATACTCCTGGCACAAATGAGGAGAAAT
 LeIF F TCAGCTACAAATCCATCTGTTCTCTGGGCTGTGATCTGCTCAGACCCACAGCCTGGGTAAAGGAGGGCCCTTGATACTCCTGGCACAAATGGGAGAAAT
 LeIF G TCAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCTCAAAACCCACAGCCTGAAATAAACAGGAGGACCTTGATGCTCATGGCACAAATGAGGAGAAAT
 LeIF H
 160 180 200 220 240
 LeIF A CTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACATTTGGATTTCCTC CAGGAGGAGTTT GGCAACCCAGTTCCAAAGGCTGAAACCATCCTCTGTCTCT
 LeIF B CTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACATTTGAAATTCCTC CAGGAGGAGTTTGGATGATTAACACAGTTCCAGAAAGGCTCAAGCCATCTCTGTCTCT
 LeIF C CTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGATTTCCGAATTCCTC CAGGAGGAGTTTGGATGATGCAACCCAGTTCAGAAAGGCTCAAGCCATCTCTGTCTCT
 LeIF D CTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACATTTGGATTTCCTC CAGGAGGAGTTTGGATGATGCAACCCAGTTCAGAAAGGCTCAAGCCATCTCTGTCTCT
 LeIF E CTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACATTTGATTTCCATCATCAGGTGTTTTCATGGCAACCCAGTTCAGAAAGGCTCAAGCCATCTCTGTCTCT
 LeIF F CTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACATTTGGATTTCCTC CAGGAGGAGTTTGGATGATGCAACCCAGTTCAGAAAGGCTCAAGCCATCTCTGTCTCT
 LeIF G CATGACATTTGGATTTCCT CAGGAGGAGTTTGGATGATGCAACCCAGTTCAGAAAGGCTCAAGCCATCTCTGTCTCT
 LeIF H CTCTCTTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACATTTGAAATTTCTC CAGGAGGAGTTTGGATGATGCAACCCAGTTCAGAAAGGCTCAAGCCATCTCTGTCTCT
 260 280 300 320 340
 LeIF A CCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCCTCTTAGACAAATTTCTACACTGAACCTCTAC
 LeIF B CCATGAGATGATCCAGCAGACCTTCAACCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGATGAGACCCCTCTTAGATGAATTTCTACATCGAACCTTGAC
 LeIF C CCATGAGATGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCCTCTTAGAATAATTTCCACTGAACCTTTAC
 LeIF D CCATGAGCTGATCCAGCAGATCTTCAACCTCTTTACCCACAAAGATTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCCTCTTAGACAAATTTCTGACCCGAACCTTAC
 LeIF E CCATGAGATGATGAGCAGACCTTCAACCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGATACTTGGGATGAGACCCCTTTTAGACAAATTTCTACACTGAACCTTTAC
 LeIF F CCATGAGATGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTACTTGGGATGAGACCCCTCTTAGAATAATTTCTGACCTGAACCTTAAC
 LeIF G CCATGAGATGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTACTTGGGATGAGACACTTCTAGACAAATTTCTACACTGAACCTTTAC
 LeIF H CCATGAGATGATGAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGGGATGAGACCCCTCTTAGAATAATTTCTACATTTGAACCTTTTC

OBR. 3

360 380 400 420 440
 Leif A CAGCAGCTGAATGACCTGGAAAGCCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACCTCCCTGATGAAGGAGGAGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATACT
 Leif B CAGCAGCTGAATGACCTGGAAAGCCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGATAGAGTCTCCCTGATGATACGAGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATACT
 Leif C CAGCAACTGAATGACCTGGAAAGCATGTGTGATACAGGAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCTGATGAAGTGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATACT
 Leif D CAGCAGCTGAATGACCTGGAAAGCCCTGTGTGATACAGGAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCTGATGAAGTGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATACT
 Leif E CAGCAGCTGAATGACCTGGAAAGCCCTGTGTGATACAGGAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCTGATGAAGTGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATACT
 Leif F CAGCAGCTGAATGACCTGGAAAGCCCTGTGTGATACAGGAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCTGATGAAGTGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATACT
 Leif G CAGCAGCTGAATGACCTGGAAAGCCCTGTGTGATACAGGAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCTGATGAAGTGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATACT
 Leif H CAGCAATGAATGACCTGGAAAGCCCTGTGTGATACAGGAGGTTGGGGTGAAGAGACTCCCTGATGAAGTGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATACT

460 480 500 520 540
 Leif A TCCAAAGAAATCACCTCTATCTGAAAGAGAAAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTACAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTTGTCAACAAA
 Leif B TCCAAAGAAATCACCTCTATCTGAAAGAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTACAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTTGTCAACAAA
 Leif C TCCAAAGAAATCACCTCTATCTGAAAGAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTACAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTTGTCAACAAA
 Leif D TCCAAAGAAATCACCTCTATCTGAAAGAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTACAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTTGTCAACAAA
 Leif E TCCAAAGAAATCACCTCTATCTGAAAGAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTACAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTTGTCAACAAA
 Leif F TCCAAAGAAATCACCTCTATCTGAAAGAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTACAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTTGTCAACAAA
 Leif G TCCAAAGAAATCACCTCTATCTGAAAGAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTACAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTTGTCAACAAA
 Leif H TCCAAAGAAATCACCTCTATCTGAAAGAGAAATACAGCCCTTGTGCCTGGGAGGTTGTACAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTTTGTCAACAAA

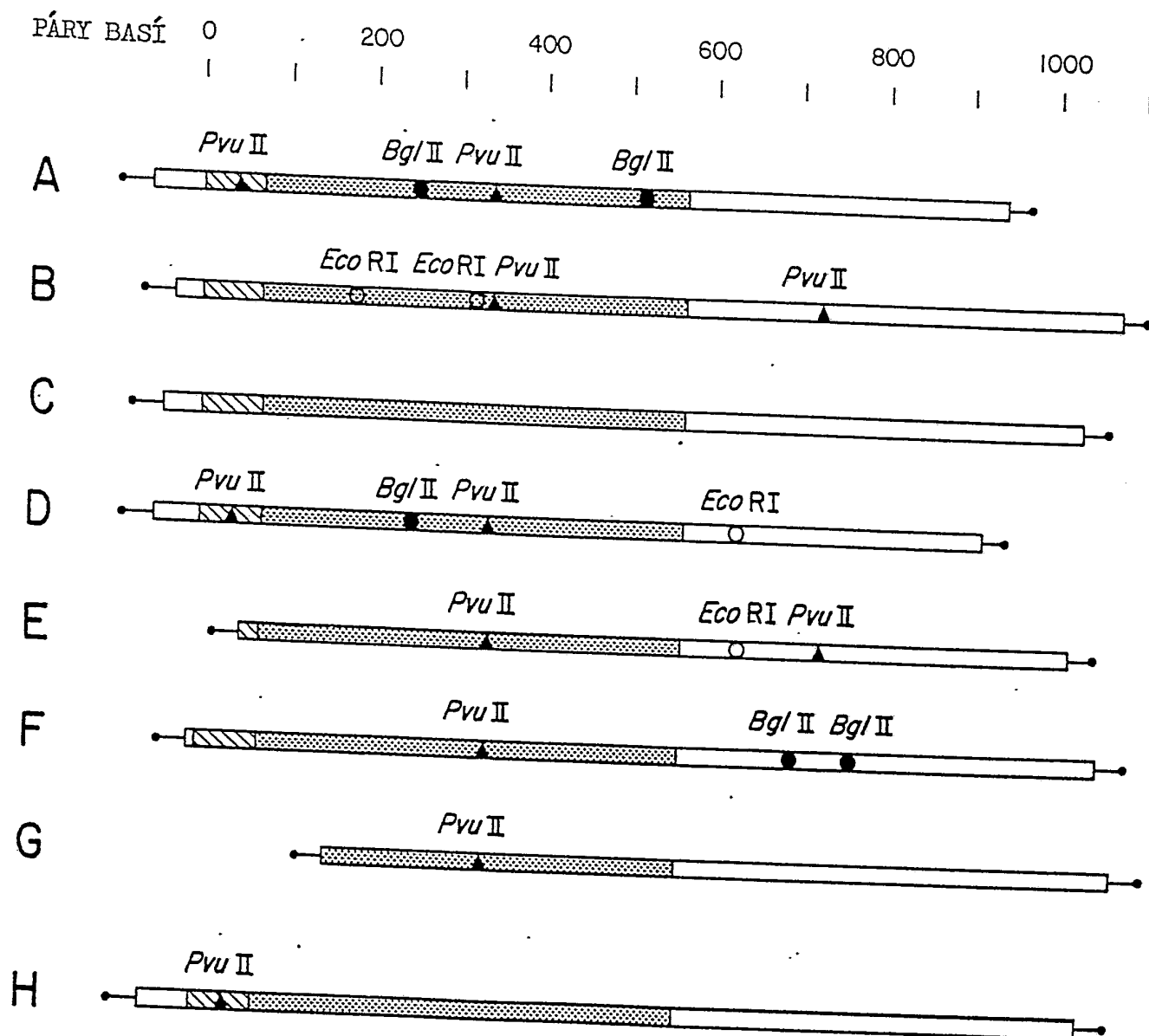
560 580 600 620 640
 Leif A CTTGCAAGAAAGTTAAGAGTAAGGAATGAAAGAACTGGTTCAACATGGAAATGATTTTTCATTTGATTCGATGCCAGCTCACTTTTTATGATCTGCCATT
 Leif B CTTGCAAGAAAGTTAAGAGTAAGGAATGAAAGAACTGGTTCAACATGGAAATGATTTTTCATTTGATTCGATGCCAGCTCACTTTTTATGATCTGCCATT
 Leif C CTTGCAAGAAAGTTAAGAGTAAGGAATGAAAGAACTGGTTCAACATGGAAATGATTTTTCATTTGATTCGATGCCAGCTCACTTTTTATGATCTGCCATT
 Leif D CTTGCAAGAAAGTTAAGAGTAAGGAATGAAAGAACTGGTTCAACATGGAAATGATTTTTCATTTGATTCGATGCCAGCTCACTTTTTATGATCTGCCATT
 Leif E CTTGCAAGAAAGTTAAGAGTAAGGAATGAAAGAACTGGTTCAACATGGAAATGATTTTTCATTTGATTCGATGCCAGCTCACTTTTTATGATCTGCCATT
 Leif F CTTGCAAGAAAGTTAAGAGTAAGGAATGAAAGAACTGGTTCAACATGGAAATGATTTTTCATTTGATTCGATGCCAGCTCACTTTTTATGATCTGCCATT
 Leif G CTTGCAAGAAAGTTAAGAGTAAGGAATGAAAGAACTGGTTCAACATGGAAATGATTTTTCATTTGATTCGATGCCAGCTCACTTTTTATGATCTGCCATT
 Leif H CTTGCAAGAAAGTTAAGAGTAAGGAATGAAAGAACTGGTTCAACATGGAAATGATTTTTCATTTGATTCGATGCCAGCTCACTTTTTATGATCTGCCATT

660 680 700 720 740
 Leif A TCAAAGACTCATGTTTCTGCTATGACCATGACACGATTTAAATCTTTCAAATGTTTTTAGGAGTATTAATCAACATGTGATTCAGCTCTTAAGGCACCTA
 Leif B TTTCAAAGACCTTGTTCTGCTAAACCATGCTATGATTAATCAAAATGTTGTCAGGAGTTTCAGGAGTGTAAAGCAACATCTGTTGAGTGTATGG
 Leif C TTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTAAACCATGCTATGATTAATCAAAATGTTGTCAGGAGTGTAAAGCAACATCTGTTGAGTGTATGG
 Leif D TTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTAAACCATGCTATGATTAATCAAAATGTTGTCAGGAGTGTAAAGCAACATCTGTTGAGTGTATGG
 Leif E TTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTAAACCATGCTATGATTAATCAAAATGTTGTCAGGAGTGTAAAGCAACATCTGTTGAGTGTATGG
 Leif F TTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTAAACCATGCTATGATTAATCAAAATGTTGTCAGGAGTGTAAAGCAACATCTGTTGAGTGTATGG
 Leif G TTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTAAACCATGCTATGATTAATCAAAATGTTGTCAGGAGTGTAAAGCAACATCTGTTGAGTGTATGG
 Leif H TCAAAGACTCATGTTTCTGCTATTAACCCACCAAGTTGAATCAAAATTTCCAAATGTTTTTAGGAGTGTAAAGCAACATCTGTTGAGTGTATGG

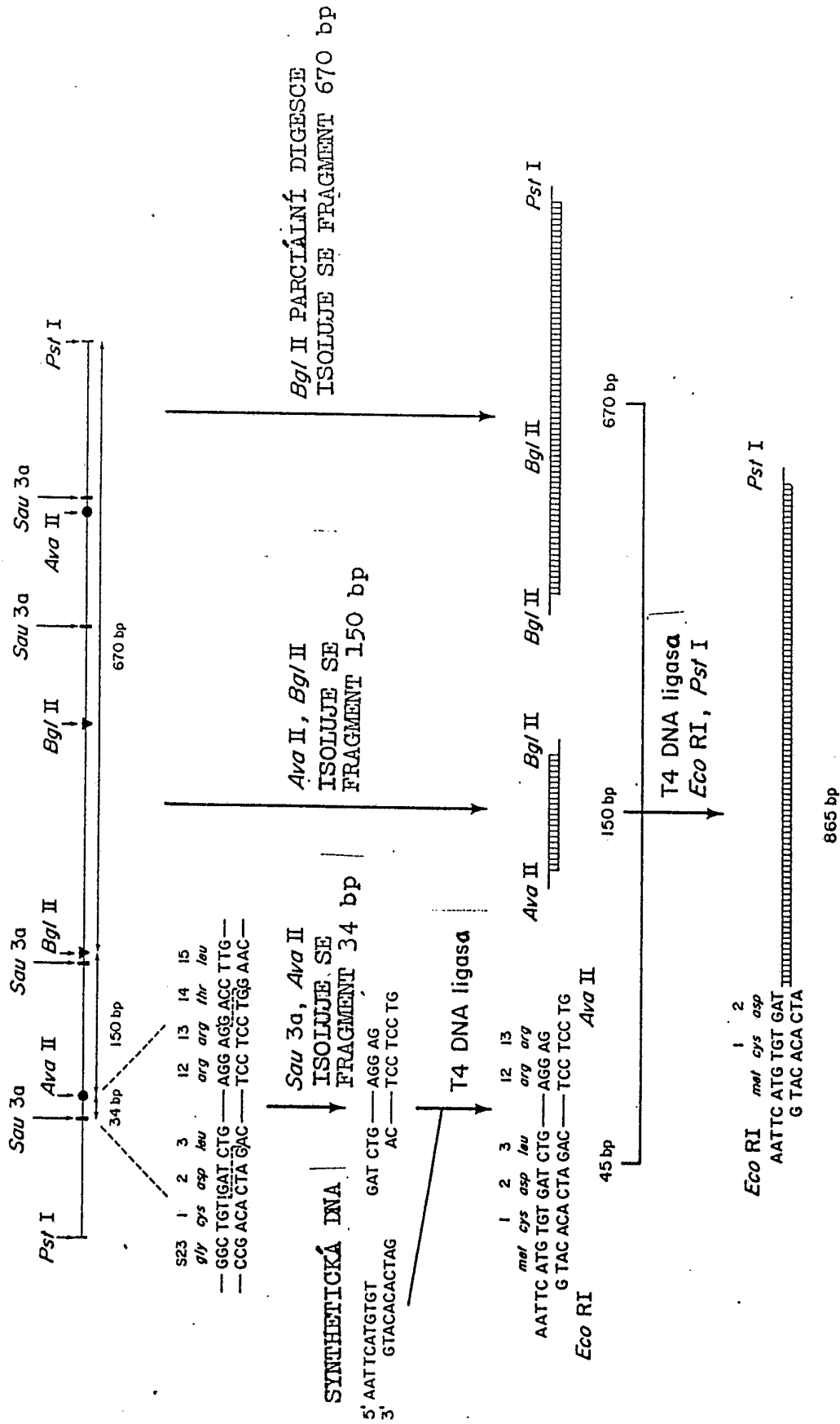
OBR.3 - POKR.1

OBR. 3 - POKR. 2

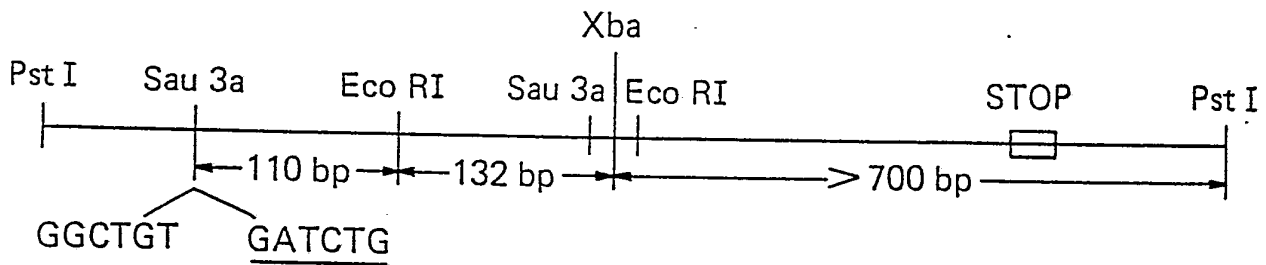
OBR. 4



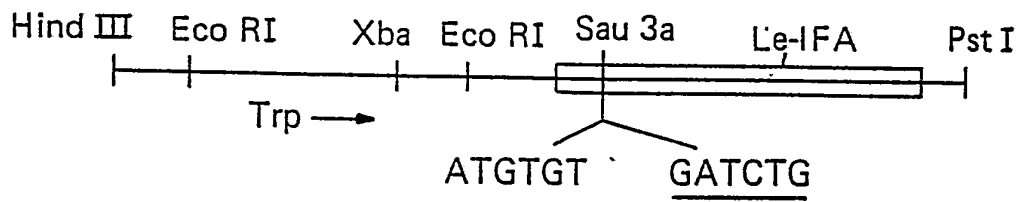
OBR. 5



CS 273 181 B2



OBR. 7a



OBR. 7b

A H I J C

A H I J U

АХИСУ

АХИЗУ

A H I 3 U

А Н И З

CS 273 181 B2

	S1		S10		S20		1		10																													
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	H	S	L	G	S	R	R	T	L
H	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	H	S	L	N	N	R	R	T	L
I	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	H	S	L	G	N	R	R	A	L
J	M	A	R	S	F	S	L	L	M	V	V	L	V	L	S	Y	K	S	I	C	S	L	G	C	D	L	P	Q	T	H	S	L	R	N	R	R	A	L
C	M	A	L	S	F	S	L	L	M	A	V	L	V	L	S	Y	K	S	I	*	S	L	G	C	D	L	P	Q	T	H	S	L	G	N	R	R	A	L

	20		30		40		50																															
A	M	L	L	A	Q	M	R	R	I	S	L	F	S	C	L	K	D	R	H	D	F	G	F	P	Q	E	E	F	-	G	N	Q	F	Q	K	A	E	T
H	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	E	E	F	D	G	N	Q	F	Q	K	A	Q	A
I	I	L	L	A	Q	M	G	R	I	S	P	F	S	C	L	K	D	R	P	D	F	G	L	P	Q	E	E	F	D	G	N	Q	F	Q	K	T	Q	A
J	I	L	L	A	Q	M	G	R	I	S	P	F	S	C	L	K	D	R	H	E	F	R	F	P	E	E	E	F	D	G	H	Q	F	Q	K	T	Q	A
C	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	E	E	F	D	G	N	Q	F	Q	K	A	Q	A

	60		70		80		90																															
A	I	P	V	L	H	E	M	I	Q	Q	I	F	N	L	F	S	T	K	D	S	S	A	A	W	D	E	T	L	L	D	K	F	Y	T	E	L	Y	Q
H	I	S	V	L	H	E	M	M	Q	Q	T	F	N	L	F	S	T	K	N	S	S	A	A	W	D	E	T	L	L	E	K	F	Y	I	E	L	F	Q
I	I	S	V	L	H	E	M	I	Q	Q	T	F	N	L	F	S	T	E	D	S	S	A	A	W	E	Q	S	L	L	E	K	F	S	T	E	L	Y	Q
J	I	S	V	L	H	E	M	I	Q	Q	T	F	N	L	F	S	T	E	D	S	S	A	A	W	E	Q	S	L	L	E	K	F	S	T	E	L	Y	Q
C	I	S	V	L	H	E	M	I	Q	Q	T	F	N	L	F	S	T	E	D	S	S	A	A	W	E	Q	S	L	L	E	K	F	S	T	E	I	Y	Q

	100		110		120																																	
A	Q	L	N	D	L	E	A	C	V	I	Q	G	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
H	Q	M	N	D	L	E	A	C	V	I	Q	E	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
I	Q	L	N	N	L	E	A	C	V	I	Q	E	V	G	M	E	E	T	P	L	M	N	E	D	S	I	L	A	V	R	K	Y	F	Q	R	I	T	L
J	Q	L	N	D	L	E	A	C	V	I	Q	E	V	G	V	K	E	T	P	L	M	N	E	D	F	I	L	A	V	R	K	Y	F	Q	R	I	T	L
C	Q	L	N	D	L	E	A	C	V	I	Q	E	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

	130		140		150		160																														
A	Y	L	K	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
H	Y	L	M	E	K	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
I	Y	L	T	E	K	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	I	L	R	R	K	D
J	Y	L	M	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	K	K	G	L	R	R	K	D
C	Y	L	I	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