



NORGE

(12) **UTLEGNINGSSKRIFT**

(19) NO

(11) **180239**

(13) B

(51) Int Cl⁶ C 12 N 15/23, C 07 K 14/57

Styret for det industrielle rettsvern

(21) Søknadsnr	875136	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	
(22) Inng. dag	09.12.87	(85) Videreføringsdag	
(24) Løpedag	09.12.87	(30) Prioritet	10.12.86, DE, 3642096
(41) Alm. tilgj.	13.06.88		
(44) Utlegningsdato	02.12.96		

(71) Søker	Boehringer Ingelheim International GmbH, D-55216 Ingelheim, DE
(72) Oppfinner	Rudolf Hauptmann, Ebreichsdorf, AT Adolf Himmler, South San Francisco, CA, US Peter Swetly, Wien, AT
(74) Fullmektig	Dag Dawes, Bryn & Aarflot AS, 0104 OSLO

(54) **Benevnelse** Ekspresjonsvektor som koder for, og kan uttrykke et polypeptid med de biologiske og immunologiske egenskapene til EqIFN- γ , vertsorganisme transformert med denne, og fremgangsmåte for fremstilling av nevnte polypeptid

(56) **Anførte publikasjoner** EP 88540, EP 88622, EP 115613, EP 161504, EP 186098
Journal of Interferon. Res., Bind 2, nr. 3, 1982, s. 363-370
Chemical Abstracts, 96, 46832h
Chemical Abstracts, 97, 209443u
Nucl. Acids. Res., (1981), 9, r43-r74

(57) **Sammendrag** Fremgangsmåte ved fremstilling av heste-interferon- γ , (equint interferon- γ , EqIFN- γ), DNA-sekvenser som koder for dette polypeptid, egnede vektorer og vertsorganismer som inneholder disse DNA-sekvenser samt EqIFN- γ selv. Gjenstand for oppfinnelsen er videre DNA-delsekvenser som koder polypeptidene som adskiller seg strukturelt fra det naturlige EqIFN- γ polypeptid. Dertil beskrives anvendelsen av proteinene.

Foreliggende oppfinnelse vedrører en ekspresjonsvektor som koder for, og kan uttrykke et polypeptid med de biologiske og immunologiske egenskapene til EqIFN- γ , en vertsorganisme transformert med ekspresjonsvektoren, og en fremgangsmåte for fremstilling av et polypeptid med de biologiske og immunologiske egenskapene til EqIFN- γ . Dertil beskrives anvendelsen av proteinene.

Interferoner er proteiner som utskilles fra eukaryotiske celler etter virusinfeksjoner eller andre stimuleringer og på sin side kan beskytte cellene mot virusinfeksjoner. Tre klasser interferoner er for tiden kjente: De angis med interferon- α , interferon- β og interferon-gamma, (forkortet IFN- α , IFN- β og IFN-gamma). De adskiller seg i sin oppbygning og i sine virkninger. Således kan interferonene påvirke immunsystemets celler regulerende eller også difrensieringen av celler og veksten av tumorer.

F. Wheelock oppdaget i 1965 et polypeptid som beskyttet bestemte celler mot virusinfeksjoner (Science 149, 310 (1965)). Polypeptider med disse egenskaper kalles Immun-Interferon, TypII-interferon, Interferon-gamma eller IFN-gamma, skjønt det her dreier seg om et polypeptid som hører til klassen lymfokiner. Ved siden av human-interferon-gamma er det hittil kjent storfe-, muse- og rotte-interferon-gamma. Alle hittil kjente gamma-interferoner foreligger i glykosilert form, hvorunder glykosileringen imidlertid ikke utøver noen innflytelse på den biologiske aktiviteten (Keller et al., J. Biol. Chem. 258, 8010 (1983)).

I lang tid ble det antatt at interferonene virker spesifikt. In vitro-forsøk viste imidlertid at IFN-preparatene fra kveg kunne utløse en antiviral virkning hos aper og hos mennesker (Tovey, M.G. et al., J. Gen. Virol 36, 341-344 (1977)). Denne arts-interaktiviteten henger muligens sammen med mer eller mindre stor homologi av genene hhv. proteinene; p.g.a de små mengder animalske interferoner kunne den antagelsen ikke kontrolleres.

Til tross for de fastslåtte arts-interaktiviteter er bivirkningene så som antigeniteter ved anvendelsen av artsfremde interferoner å finne som ikke kan tolereres for en terapi.

Da imidlertid på den annen side nytte- og husdyrhold har en betydelig økonomisk verdi, består et behov for interferoner for de forskjellige arter som veterinæren kan anvende.

Meget rent dyreinterferon fra forskjellige arter ville dertil by på kjærkommen anledning til å undersøke virkemekanismene for interferoner, for å komme til modellforestillinger som kunne overføres til menneskene.

De første undersøkelser med animalske interferoner ble utført med preparater av naturlig cellemateriale; utbytte og renhet av interferoner fremstilt ved denne fremgangsmåten viser at de er uegnet for fremstilling av legemidler.

Ved utviklingen av den rekombinante DNA-teknikk er det mulig å produsere heterologe proteiner fra mikroorganismer. Således ble det f.eks. også fremstilt human-interferoner (Hu-IFN); i den seneste tid også forskjellige ikke-human-interferoner.

Opgaven for foreliggende oppfinnelse var å fremstille heste-interferon-gamma på genteknisk måte og frembringe de nødvendige DNA-sekvenser for dette.

Denne oppgaven løses ved anvendelse av den såkalte probeteknikk. Som probe anvendtes en DNA-sekvens kjent fra litteraturen avledet fra det humane gamma-interferon (Gray og Goeddel; Nature 298, 859-863 (1982)).

Likeledes er imidlertid også del- eller fullstendige sekvenser fra andre gamma-interferoner egnet som prober. Som utgangsmateriale ved søkningen tjente et DNA-bibliotek som stammet fra hestens normale levervev. For første gang kunne derigjennom genet som koder for EqIFN-gamma med de flankerende områder og den etterfølgende formel I isoleres:

CCACAAGAATGGCACGGGTGGGCATAATGGGTCTGTCTCATCGTCAAAGACCCAAGGAG 5
 TTGAAAGGAAACTCTAACTACAACACCAAATGCCACAAAACCATAGTTATTAATACAAA 65
 CTAAGTAGCATCTGTGCCTATCTGTCAACCATCTCATCTGAAAAAACTTGTGAAAATACGT 125
 AATCCTGATGAGACTTCAATTAGGTATAAAAACCAGCCCCAGAAGGCGAGGCAGTACACT 185
 CTTCTGATCGCCGGTAGGGCAGCTATTAGAAAAGAAAGATCAGCTGAGGCCTTGGGACCT 245
 GATCAGCTTAGTACAGAAGTGACTGCTTCAACTACTTAGGCCTAACTCTCTCCGAAACA 305
 365

-20 -15 -10
 Met Asn Tyr Thr Ser Phe Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ala Ile
 ATG AAT TAT ACA AGT TTT ATC TTG GCT TTT CAG CTG TGT GCG ATT 410

-5 -1 1 5 10
 Leu Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Ala Phe Phe Lys Glu
 TTG GGT TCT TCT ACC TAT TAC TGC CAG GCC GCG TTT TTT AAA GAA 455

15
 Ile Glu Asn Leu Lys Glu Tyr Phe
 ATA GAA AAC CTA AAG GAA TAT TTT GTAAGTATGACCTTTTAATAATACTTAC 507

I N T R O N 1

TTGTGGTTGAAATGACTGAACGTTGTCTTGGAGTTGGATCTCTGATAGGCTGTCCTCTCT 567
 ACTCCACAGTCATCTTGAGAAGACTGGGTGTTATTTTCTCTGTTTGTGACTGGATGAGT 627
 TTTTCTTTTTTTTACTAAATGATCTAGATATTGCTTTAACCCTCTGCTCAATTTGCTATA 687
 GAGACTTAGAGAGGGTTCATGAATCTTCCAAAAGATGGGCTTAACAGGTTTATAAAGCAT 747
 AGTGAAGTTGACAATTTTGTGGTGAGAAGCCACTGAATTGTGATAAGTCAAGTAGTGTGG 807
 ACATTGAAAAAATGACTAGCTATTAGTTTCTAACTTCTCAGGTTACTATGATGGTGACAA 867
 TAAAAGGTCAAGATTAGCATTAAAATGGTAATCTGAAATAATTGATCAGTTAAAGAAGGC 927
 GCTGTCCTGAAAGGTTTGGCTGAAAAAAAATCACTTTCAGGTGTTTTCTCCAAAAAATG 987
 ATTTTAAAATCTTACTGCCCCGTTTGTGTTAGCTGTGAAGTACTCTGGAACCTCAGTCAAT 1047
 TGCTGAGATTTTGTACGAGTTATAAGCTGGCTTATATTTAAAAAATTTTTTTGTTTTTGT 1107
 TTTATGAGTTTCTTTTAAAATGTTATTTATGGTAAATTAATAAGTTTTTGCATTTTAA 1167
 TATTTTATTATTTGTCCAAAATTTAGCTATTTAATTAAGTTGGAGCTCTCTTTTAGAG 1227
 CTGACATAAGACCATAGGGGAGGCACAGATAGATGTGATGGAGCCCTGTACCAGACGGGG 1287
 GCAGTATCTTATAGTGGGTTGCCTTTGCTGATCTTTTTACTAGACTTGAAATTATTTGCT 1347
 TTTCTTCTATGGTTATTTGGGACTATTGAAGTATCACCAGCCCTGTTGAGTTCATCTG 1407
 TAATATTGTAATTCAAGGGTTACACTAGAAAATAAGAAAGCTAAAACAGCACGATAATCT 1467
 TTGGCTACATCCAACACAATAGCTTTTGGGAATACTTATTGTTAGAACTAAAACAGAGGGT 1527
 TGAAAAGAAAATCAGTGAATACTGTCAGCATCTGAGTTCAATAAAAACGTGAAGTACATTT 1587

20
 Asn Ala
 TTAGGGCAATTCATGGACTAATTGTAAACCAAGTTTTCTTCCTTTTTTCAG AAC GCA 1644

25 30 35
 Arg Asn Pro Asp Val Gly Asp Gly Gly Pro Leu Phe Leu Asp Ile
 AGA AAC CCA GAT GTA GGG GAT GGT GGG CCT CTT TTC CTG GAT ATC 1689

40 I N T R O N 2
 Leu Lys Asn Trp Lys Glu
 TTG AAG AAC TGG AAA GAG GTAAGCTAAGTATTTCCATTGGTTGATTTTCCTGT 1743
 TGCTTATTTTCTGGTGGATGAATTCACACCAACCTCTCTTTGTGCTCTTTTCTCCCTAG 1802

45 50 55
 Asp Ser Asp Lys Lys Ile Ile Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr
 GAT AGT GAC AAA AAA ATA ATT CAG AGC CAA ATC GTC TCC TTC TAC 1847

60 65 70
 Phe Lys Leu Phe Glu Asn Leu Lys Asp Asn Gln Val Ile Gln Lys
 TTC AAA CTC TTT GAA AAC TTG AAA GAT AAC CAG GTC ATT CAA AAG 1892

75 80 85
 Ser Met Asp Thr Ile Lys Glu Asp Leu Phe Val Lys Phe Phe Asn
 AGC ATG GAC ACC ATC AAG GAG GAC CTG TTC GTT AAG TTC TTT AAC 1937

90 95 100
 Ser Ser Thr Ser Lys Leu Glu Asp Phe Gln Lys Leu Ile Gln Ile
 AGC AGC ACC AGC AAG CTG GAA GAC TTC CAA AAG CTG ATT CAG ATT 1982

I N T R O N

Pro
 CCG GTGAGGAGATCTTAATTCTTTCTTTGGTTTCATTACAGAGGTTCTTGCAAAGTGCT 2041
 TACGTCCCAGAAAGTAGAAATGAACTATGAAATGAACCCGTGGCCAAAACCTCCTCCTTCC 2101
 TAATTCCATTTGTGCTTTGAGAGACTTTGCTAAGTCAGTATGGGAATCATTAAATTTGT 2161
 GATTTGGGGAAATGCTGGCACTATGACTACTGCACAAAGGCAGGTGAAGGGACAAATCCA 2221
 GTGAGGAGGGGGCAGTGAAGAAGTGGAGGGGAGTCTGGAGAAGCAGGTCTCTCCTTGCCC 2281
 CTTGTTTCGTGAGATGAAATCCTCCTGCTTTGGATGGGAGGCTGCGTGTCTTGGTGGAAAG 2341
 AGCAGTGGGAGGAGGGAGAAGATTTGTGCTCCTCCCAGCTCAGCCACCAAGAAACTGTGA 2401
 CCTCAGATGAATCACAGGCCTGGCTGGGGCTCAGTTTCCTCATCTTAAAAGAGGCCTATT 2461
 GGGTTCACTAAAATTTCTATGATCTTCTTTGCTCTATAATCCTACAATTCTGTGGACAGA 2521
 AAATGAAATGAGGTAGGAGAAAGAAATAGCCTTTGAAGAGGTTCTTGGGCATTCCTACTGC 2581
 CAGGCTCTGGTCAACCTTCATACTCTGCAGCCCAAGAAGAGGCAAGACCATTGTCTGTT 2641
 TTTGGAAATGCAAATAGGCGGCATTTATACCTCACGAAAGAAGTGTCTGTCAACTTTTG 2701
 GATACTGGGCTATCTTGGCTGGAGAAATCCTTAGGCTCCCAAATTTCTCTCATGAAATT 2761
 GTCTTGAGTCTTTAAATTTATGGCTTCTCGAAGCTGAGAGATAACTTTAAGCATAAAGAC 2821
 AAATTACATTTTCCAACATTTTGTCTAAGAGACAAAGACCTCCACATGCCTTTGGGTTG 2881
 GCCTGGATCTAAATGGGCTTGAATGAGAAGGGGAGGGTGTGTTATGACTATGTTTAGAA 2941
 GAGAAAACAGAGGTTTGGAGAGGTTAAGTGGCTGGTTCAAAGTCAGAGTTATTGCACACA 3001
 CAGGATTCGAACCCATATGTTTTGTCCCTCCACTTTAGGGTTCTTTTCGCTACATAATTT 3061
 TGAGAATTCTGTACCAGTCAATTTAAGGATGTGTGATGTTCCCATCCTATTACAGCACA 3121
 ACCAGCAATTTAATTATAATTTTAGTCTTAACTGCTGAAGAAAGCAGCATTACATATTAA 3181
 GCTAACATATTCCTGGTGAAAGCAACTTTTTCAAAGGAATATTTCTATTTTCATGGACCA 3241
 TGACAGTAGCACAGCCTGATGGCTTGATGCCTGAAACTAATTTTGCTGTTTTCTTTCC 3301

105 110 115
 Val Asn Asp Leu Lys Val Gln Arg Lys Ala Ile Ser Glu Leu
 AATAG GTA AAT GAT CTG AAG GTC CAG CGC AAA GCA ATA AGT GAA CTC 3348

120 125 130
 Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Ser Pro Lys Ala Asn Leu Arg Lys
 ATC AAA GTG ATG AAT GAT CTG TCG CCC AAA GCT AAC CTG AGG AAG 3393

180239

135 140 145
Arg Lys Arg Ser Gln Asn Pro Phe Arg Gly Arg Arg Ala Leu Gln
CGG AAG AGG AGT CAG AAT CCA TTT CGA GGC CGG AGA GCG TTG CAA 3438

TAG TGGTCATCCTGCCTGCAATATTTGAATTTTTAAATCTAAATCTATTTATTAATATT 3497
TAATATTTTACATTATTTATATGGGGAATATATTTTTAAACTCATCAAAGTATTTATAAT 3557
AGCAACTTTTATGTAATGAAAATGGGTATCTATTAATATATATATTATTTATAATTCCTG 3617
TATGGTGTGACTATTTCACTTGACCCTTTTTTTCTGACCAACTAGGCAAGATTATGTGA 3677
TTACAAGGCTTTAACTCAGGGGCCAACTAGGGAGTGGGTAGCCGACCTACCAAGACCCTG 3737
TGAGCTGTGTGTTTATTTCCCTCAATGATACAATGAACACTTATAAAGGAAAGGAGGGCC 3797
TCCAGTCACTGCCTGTTGGAGAACATGTCTGCATTGTGAGCCACTGCTTAATGGCATGTC 3857
AAACCACGCTTGAATGTGTCAGATGATAGGGCTTGTCCCCTGATAAAGCTTAGTATCTCC 3917
TCTCATGCCTAGTGCTTCAGAATATTTGTTGACAACCTGTGACTGCACCCAAATGGAAAGTA 3977
ATTTATTTGTTTAGTTTACCAATATTTAATAAATATGAATAAAGTATAATTTCATAACTA 4037
TTTATGCTGCGTCCGGCTTTTCTAAGTGAGGACTGGGGTAAATGAACTACAAACTAATG 4097
AATCAGTAAGAGGGAACCTCGTTTTTAGCGGTGGAAATCTTAGCTGGATTAAGCCCCATGA 4157
AACGTGGTATTTCTCTCCACTGGAGATTTGTTGGCTACTACTCCTCCATGTAGCAGCTCT 4217
TTATCTTTCCAAAATATAAATTTAATTATGTCACCATTTACTTCAGAGCTTCTGCGATGG 4277
AAAGTAGTTCAAATAGTTTAGCTTAGCACACAAAGCTTTGTTTCTCCCTCCTCCCTCAAC 4337
TCTGCACTGTGCTCTTCATCTTGGTGTCCCCACGTCCTCTGTCCACTTCGGGCAAACCAC 4397
CGGGAATGTCATGGTGAGGGTGAGCTCTAGGGAGAGAGGGCTGGATTAGAATTTCGGCC 4457
CACCATTACCAGTAGTATGACCTTTAATGAATTAAGTGTATTCTCTAAGCTCCAGTTTCC 4517
TCATCTGACACAAGAGAATAATTGTGCCTAAAATTTGGTGAGAGTTTGTCTTTTCACTC 4577
AAGAAGTGTTTACTGGAGCATCCACTAGTTGCCTAGTGCTGTTCTAGGCACTTGAGATAC 4637
ATTTGTGAACAAAATAGTCAAGGATCC 4664

Bemerkelsesverdig er det at EqIFN-gamma i likhet med alle andre hittil kjente gamma-interferoner i den aktuelle organisme kodes for av et gen som har store sekvenser som avbryter strukturgenet: Genene består av eksoner og introner, hvorunder bare eksonene koder for proteinet. Introner kan bare forstås av bestemte systemer, f.eks. av systemer i pattedyrceller. For andre systemer, f.eks. i E.coli, kan DNA-sekvensen som inneholder introner ikke anvendes.

En videre oppgave for den foreliggende oppfinnelse var det derfor å frembringe en intron-fri DNA-sekvens som koder for EqIFN-gamma.

Løsningen av denne oppgaven er prinsipielt mulig på to måter.

1. På veien fra cellekjernen hvori transkripsjonen finner sted skjæres intronene ut i cytoplasmaet og ved spleising av ekson-RNA-fragmentene dannes mRNA-et til det eukaryotiske proteinet. Dette mRNA lar seg omkopiere med et enzym, den reverse transkriptase, i et DNA som kalles "copy-DNA" (cDNA).

1		5		10		15								
TAT	TAC	TGC	CAG	GCC	GCG	TTT	TTT	AAA	GAA	ATA	GAA	AAC	CTA	AAG
		20		25		30								
GAA	TAT	TTT	AAC	GCA	AGA	AAC	CCA	GAT	GTA	GGG	GAT	GGT	GGG	CCT
		35		40		45								
CTT	TTC	CTG	GAT	ATC	TTG	AAG	AAC	TGG	AAA	GAG	GAT	AGT	GAC	AAA
		50		55		60								
AAA	ATA	ATT	CAG	AGC	CAA	ATC	GTC	TCC	TTC	TAC	TTC	AAA	CTC	TTT
		65		70		75								
GAA	AAC	TTG	AAA	GAT	AAC	CAG	GTC	ATT	CAA	AAG	AGC	ATG	GAC	ACC
		80		85		90								
ATC	AAG	GAG	GAC	CTG	TTC	GTT	AAG	TTC	TTT	AAC	AGC	AGC	ACC	AGC
		95		100		105								
AAG	CTG	GAA	GAC	TTC	CAA	AAG	CTG	ATT	CAG	ATT	CCG	GTA	AAT	GAT
		110		115		120								
CTG	AAG	GTC	CAG	CGC	AAA	GCA	ATA	AGT	GAA	CTC	ATC	AAA	GTG	ATG
		125		130		135								
AAT	GAT	CTG	TCG	CCC	AAA	GCT	AAC	CTG	AGG	AAG	CGG	AAG	AGG	AGT
		140		145										
CAG	AAT	CCA	TTT	CGA	GGC	CGG	AGA	GCG	TTG	CAA	TAG			

Formel II .

Disse intron-frie DNA kan så innsettes i egnede plasmider som deretter sammen med egnede vertsorganismer, f.eks. E.coli, kan anvendes for produksjon av eukaryotiske proteiner i foreliggende tilfelle av EqIFN-gamma. Degenerasjonen av den genetiske kode kan virke uheldig ved denne fremgangsmåten. Denne degenerasjonen fører nemlig til at forskjellige organismer anvender forskjellige kodoner for de samme aminosyrer. Ved ikke-optimal tilpasning av det anvendte DNA kan man derfor få en dårligere ekspresjon av et eukaryotisk protein i en prokaryotisk system.

2. Den andre mulighet til å oppnå en intron-fri DNA-sekvens for et eukaryotisk gen består i med kjennskap til den kromosomale DNA-sekvens kjemisk å syntetisere en intron-fri DNA-sekvens.

Som spesielt egnet for løsningen av oppgaven for oppfinnelsen viste DNA-sekvensen med formel III seg å være

-1	1				5					10				15	
ATG	TAC	TAC	TGC	CAG	GCT	GCT	TTC	TTT	AAA	GAA	ATC	GAA	AAC	CTG	AAA
				20					25						
GAA	TAC	TTC	AAC	GCT	CGT	AAC	CCA	GAC	GTT	GGT	GAC	GGT	GGT	CCG	
				35					40					45	
CTG	TTC	CTG	GAC	ATC	CTG	AAA	AAC	TGG	AAA	GAA	GAC	TCT	GAC	AAA	
				50					55					60	
AAG	ATC	ATC	CAG	TCT	CAG	ATC	GTT	TCT	TTC	TAC	TTC	AAA	CTG	TTC	
				65					70					75	
GAA	AAC	CTG	AAA	GAC	AAC	CAG	GTT	ATC	CAG	AAA	TCG	ATG	GAC	ACT	
				80					85					90	
ATC	AAA	GAA	GAT	CTG	TTC	GTT	AAA	TTC	TTC	AAC	TCG	TCG	ACT	TCT	
				95					100					105	
AAA	CTG	GAA	GAC	TTC	CAG	AAA	CTG	ATC	CAG	ATC	CCA	GTT	AAC	GAC	
				110					115					120	
CTG	AAA	GTT	CAG	CGT	AAG	GCT	ATC	TCT	GAA	CTG	ATC	AAA	GTT	ATG	
				125					130					135	
AAC	GAC	CTG	TCT	CCA	AAA	GCT	AAC	CTG	CGT	AAA	CGT	AAA	CGT	TCT	
				140					145						
CAG	AAC	CCA	TTC	CGT	GGT	CGT	CGT	GCT	CTT	CAG	TAA				

Formel III

som kan fremstilles etter i og for seg kjente fremgangsmåter.

16 forskjellige oligonukleotider ble nå syntetisert i to varianter. Den første fullstendige varianten koder for ferdig EqIFN-gamma med 146 aminosyrer pluss startmetionin (formel III), den andre for et polypeptid som er forkortet med 3 aminosyrer på amino-enden pluss startmetionin.

-1	1				5					10				15	
ATG	CAG	GCT	GCT	TTC	TTT	AAA	GAA	ATC	GAA	AAC	CTG	AAA	GAA	TAC	TTC
				20					25					30	
AAC	GCT	CGT	AAC	CCA	GAC	GTT	GGT	GAC	GGT	GGT	CCG	CTG	TTC	CTG	
				35					40					45	
GAC	ATC	CTG	AAA	AAC	TGG	AAA	GAA	GAC	TCT	GAC	AAA	AAG	ATC	ATC	
				50					55					60	
CAG	TCT	CAG	ATC	GTT	TCT	TTC	TAC	TTC	AAA	CTG	TTC	GAA	AAC	CTG	
				65					70					75	
AAA	GAC	AAC	CAG	GTT	ATC	CAG	AAA	TCG	ATG	GAC	ACT	ATC	AAA	GAA	
				80					85					90	
GAT	CTG	TTC	GTT	AAA	TTC	TTC	AAC	TCG	TCG	ACT	TCT	AAA	CTG	GAA	
				95					100					105	
GAC	TTC	CAG	AAA	CTG	ATC	CAG	ATC	CCA	GTT	AAC	GAC	CTG	AAA	GTT	
				110					115					120	
CAG	CGT	AAG	GCT	ATC	TCT	GAA	CTG	ATC	AAA	GTT	ATG	AAC	GAC	CTG	
				125					130					135	
TCT	CCA	AAA	GCT	AAC	CTG	CGT	AAA	CGT	AAA	CGT	TCT	CAG	AAC	CCA	
				140			143								
TTC	CGT	GGT	CGT	CGT	GCT	CTT	CAG	TAA							

Formel IIIa

Begge varianter lar seg lett modifisere ved at man i stedet for ATG som koder for metionin tilknytter en sekvens som koder for et hydrofobt signalpeptid, f.eks. med formel IV.

ATG AAT TAT ACA AGT TTT ATC TTG GCT TTT CAG CTG TGT GCG ATT
TTG GGT TCT TCT ACC

Formel IV

Ved en slik signalfrekvens bevirkes sekresjonen av det ønskede polypeptid fra cytoplasmaet i bestemte vertsorganismer. Herunder behandles proteinet og signalpeptidet avspaltes; man får det ferdige protein. Celler av vertsorganismer, f.eks. E.coli, som ikke er i stand til å behandle polypeptider som inneholder signalpeptidsekvensen, må opp-

sluttes for å isolere det "uferdige" polypeptid. Også disse "uferdige" EqIFN-gammaer med fullstendig eller ufullstendig signalpeptidsekvenser er gjenstand for foreliggende oppfinnelse.

Startmetioninet lar seg skille fra på i og for seg kjente fremgangsmåter, f.eks. med CNBr eller CNCl, for å oppnå ferdig EqIFN-gamma.

Denne DNA-sekvensen koder for EqIFN-gamma, men inneholder utelukkende slike kodoner som anvendes i sterkt eksprimerte celleegne gener hos E.coli (Gouy og Gautier, Nucl. Acids Res. 10, 7055 (1982)).

En oppgave for foreliggende oppfinnelse besto videre i for første gang å frembringe EqIFN-gamma i homogen ren form.

Som allerede nevnt er isoleringen og rensingen av EqIFN-gamma fra naturlig cellemateriale ikke egnet for å løse denne oppgaven tilfredstillende. I oppfinnelsen anvendes derfor DNA-sekvensene med formel II, III og IIIa for løsning av denne oppgaven. Denne sekvensen utstyres med tilsvarende kontrollsekvenser, innbygges i egnede vektorer og vertsorganismer eller vërtscellekulturer som er transformert med disse dyrkes.

Ekspresjonsvektoren ifølge oppfinnelsen av den innledningsvis nevnte art er særpreget ved at den omfatter et DNA-molekyl som koder for et polypeptid med de biologiske og immunologiske egenskapene til EqIFN- γ med en sekvens som inneholder tryptofan-promotoren, valgt fra gruppen

```
R1 TACTGCCAGG CTGCTTTCTT TAAAGAAATC GAAAACCTGA AAGAATACTT 50
    CAACGCTCGT AACCCAGACG TTGGTGACGG TGGTCCGCTG TTCCTGGACA 100
    TCCTGAAAAA CTGGAAAGAA GACTCTGACA AAAAGATCAT CCAGTCTCAG 150
    ATCGTTTCTT TCTACTTCAA ACTGTTTCGAA AACCTGAAAG ACAACCAGGT 200
    TATCCAGAAA TCGATGGACA CTATCAAAGA AGATCTGTTC GTTAAATTCT 250
    TCAACTCGTC GACTTCTAAA CTGGAAGACT TCCAGAAACT GATCCAGATC 300
    CCAGTTAACG ACCTGAAAGT TCAGCGTAAG GCTATCTCTG AACTGATCAA 350
    AGTTATGAAC GACCTGTCTC CAAAAGCTAA CCTGCGTAAA CGTAAACGTT 400
    CTCAGAACCC ATTCCGTGGT CGTCGTGCTC TTCAGTAA,
```

hvor i R¹ betyr

```
ATGAATTATA CAAGTTTTAT CTTGGCTTTT CAGCTGTGTG CGATTTTGGG 50
TTCTTCTACC TAT,
ATGTAT,
```

eller

TAT

og

```

R2GCTGCTTTCT TTAAAGAAAT CGAAAACCTG AAAGAATACT TCAACGCTCG 50
TAACCCAGAC GTTGGTGACG GTGGTCCGCT GTTCCTGGAC ATCCTGAAAA 100
ACTGGAAAGA AGACTCTGAC AAAAAGATCA TCCAGTCTCA GATCGTTTCT 150
TTCTACTTCA AACTGTTTCGA AAACCTGAAA GACAACCAGG TTATCCAGAA 200
ATCGATGGAC ACTATCAAAG AAGATCTGTT CGTTAAATTC TTCAACTCGT 250
CGACTTCTAA ACTGGAAGAC TTCCAGAAAC TGATCCAGAT CCCAGTTAAC 300
GACCTGAAAG TTCAGCGTAA GGCTATCTCT GAACTGATCA AAGTTATGAA 350
CGACCTGTCT CCAAAGCTA ACCTGCGTAA ACGTAAACGT TCTCAGAACC 400
CATTCCGTGG TCGTCGTGCT CTTCAGTAA,

```

hvori R² betyr

```

ATGAATTATA CAAGTTTTAT CTGGGCTTTT CAGCTGTGTG CGATTTTGGG 50
TCTTCTACCC AG,
ATGCAG,

```

eller CAG

eller redundante variasjoner av de nevnte DNA-sekvenvene, hvilket DNA-molekyl er egnet for ekspresjon i Echerichia coli og er funksjonelt bundet til en ekspresjonskontrollsekvens.

De dannede polypeptider isoleres og renses ved kjente fremgangsmåter. De oppnådde polypeptider tilsvarer den følgende formel:

1	5	10	15
Tyr Tyr Cys Gln Ala	Ala Phe Phe Lys Glu	Ile Glu Asn Leu Lys	
	20	25	30
Glu Tyr Phe Asn Ala	Arg Asn Pro Asp Val	Gly Asp Gly Gly Pro	
	35	40	45
Leu Phe Leu Asp Ile	Leu Lys Asn Trp Lys	Glu Asp Ser Asp Lys	
	50	55	60
Lys Ile Ile Gln Ser	Gln Ile Val Ser Phe	Tyr Phe Lys Leu Phe	
	65	70	75
Glu Asn Leu Lys Asp	Asn Gln Val Ile Gln	Lys Ser Met Asp Thr	
	80	85	90
Ile Lys Glu Asp Leu	Phe Val Lys Phe Phe	Asn Ser Ser Thr Ser	
	95	100	105
Lys Leu Glu Asp Phe	Gln Lys Leu Ile Gln	Ile Pro Val Asn Asp	
	110	115	120
Leu Lys Val Gln Arg	Lys Ala Ile Ser Glu	Leu Ile Lys Val Met	
	125	130	135
Asn Asp Leu Ser Pro	Lys Ala Asn Leu Arg	Lys Arg Lys Arg Ser	
	140	145	
Gln Asn Pro Phe Arg	Gly Arg Arg Ala Leu	Gln ***	

hhv.

Gln Ala Ala Phe Phe Lys Glu Ile Glu Asn Leu Lys
 Glu Tyr Phe Asn Ala Arg Asn Pro Asp Val Gly Asp Gly Gly Pro
 Leu Phe Leu Asp Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Asp Ser Asp Lys
 Lys Ile Ile Gln Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe
 Glu Asn Leu Lys Asp Asn Gln Val Ile Gln Lys Ser Met Asp Thr
 Ile Lys Glu Asp Leu Phe Val Lys Phe Phe Asn Ser Ser Thr Ser
 Lys Leu Glu Asp Phe Gln Lys Leu Ile Gln Ile Pro Val Asn Asp
 Leu Lys Val Gln Arg Lys Ala Ile Ser Glu Leu Ile Lys Val Met
 Asn Asp Leu Ser Pro Lys Ala Asn Leu Arg Lys Arg Lys Arg Ser
 Gln Asn Pro Phe Arg Gly Arg Arg Ala Leu Gln ***

Formel Va

Ved anvendelse av den kromosomale sekvens (formel II) får man etter transformasjon av pattedyrceller EqIFN-gamma i den naturlige forekommende, glykosylerte form (autentisk EqIFN-gamma).

Sekvensene med formel II, III hhv. IIIa er f.eks. egnet for fremstilling av EqIFN-gamma i mikroorganismer, spesielt ved fremstillingen av EqIFN-gamma i E.coli, hvorunder polypeptidet eksprimeres i ikke-glykosylert form.

En videre oppgave for foreliggende oppfinnelse besto i å frembringe modifikasjoner av det naturlige EqIFN-gamma.

Modifikasjoner av et protein kan man fremstille, idet man f.eks. enten derivatiserer proteinet eller fragmenterer ved enzym-spaltning, eller modifierer DNA-sekvensen som koder for proteinet ved delesjon eller fragmentering, og bringer denne sekvensen til ekspresjon i en egnet vertsorganisme.

For bruk i oppfinnelsen syntetiseres DNA-sekvensene som koder for modifikasjoner av EqIFN-gamma. For å muliggjøre en enkel manipulasjon av genet for forandringer av enkelte avsnitt, innbygges flere singulære restriksjonsenzym-

spaltningssteder i den fullstendige DNA-sekvensen.

Et polypeptid med de biologiske og immunologiske egenskapene til EqIFN- γ fremstilles ifølge oppfinnelsen ved at

- a) E. coli transformeres med en ekspresjonsvektor ifølge krav 1-3 som koder for, og er istand til å uttrykke, dette polypeotid; og
- b) denne transformerte E.coli mikroorganismen dyrkes, og
- c) polypeptidet isoleres.

For å løse den stilte oppgaven, ble høymolekylære DNA fra et vev av hester, fortrinnsvis fra leveren isolert etter en modifisert fremgangsmåte ifølge Blin og Stafford (Blin, N.; Stafford, P.W. Nucl. Acids Res. (1976) 3 2303-2308) og fragmentert statistisk ved hjelp av spesielle endonukleaser. De derved oppnådde forskjellige store fragmenter ble fraksjonert etter størrelsen, fortrinnsvis for dannelsen av 10 - 23 kb fragmenter, for å klones i en vektor, f.eks. i en lambda-vektor, f.eks. lambda EMBL3A. Deretter ble disse vektorer formert etter transformasjon i en vertsorganisme, f.eks. E.coli. Dette equine DNA-bibliotek ble undersøkt ved hjelp av en human gamle-interferon "probe" under ikke stringente hybridiseringsbetingelser. Den lave stringens gjøre det mulig å finne DNA-sekvenser med forskjeller fra "proben".

De kan enten fremstilles ved spaltning av kjente plasmider fra litteraturen ved hjelp av restriksjonsenzymmer eller ved kjemisk syntese ved hjelp av i og for seg kjente oligonukleotid-syntese-fremgangsmåter. Denne "probe" har sekvensen som koder for HuIFN-gamma. Fem lambda-kloner kunne identifiseres som ga positive hybridiseringssignaler.

Fra disse isolerte rekombinante fager ble DNA-et rensert ved vanlige metoder. Fag-DNA-ene ble karakterisert etter spaltning med forskjellige restriksjonsenzymmer og etterfølgende Southern-analyse (Southern, J. Mol. Biol. 98: 503-517, 1975) ved hybridisering med HuIFN-gamma "proben". Et singulært hybridiserende 4,6 kb langt BamHI fragment fra klonet lambda Eq-gamma-2 ble isolert og klonet i BamHI

skjæringsstedet til plasmidet pUC9 (Vieira og Messing, Gene 19: 259-268, 1982).

Etter transformasjon av E.coli, f.eks. JM101, ble plasmid-DNA fremstilt fra de oppnådde kolonier i en minifremstillings-prosess (Birnboim og Doly, Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523, 1979) og karakterisert ved spaltning med restriksjonsenzymmer. Et plasmid med det ønskede BamHI-innskudd ble kalt pAH111. Kantene til BamHI-innskuddet fra plasmid pAH111 ble sekvens-bestemt etter didesoksy-metoden (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977) etter innføring i M13mp8 hhv. M13mp9 vektorene (Vieira og Messing, Gene 19: 259-268, 1982). En sekvenssammenligning med det humane gamma-interferon-gen (Gray og Goeddel, Nature 298: 859-863, 1982) viste høy homologi med de ikke-kodende 5'- og 3'-områdene. Derav sluttet man at det fullstendige EqIFN-gamma ble isolert.

Det 4,6 kb lange BamHI-innskudd fra plasmid pAH111 ble sekvensbestemt fullstendig ved didesoksy-metoden. Total-sekvensen av BamHI-fragmentet ble bestemt ved kombinasjon av delsekvenser av M13-subkloner, som beholdtes ved rettet kloning av restriksjonsfragmenter (EcoRI, HindIII, PstI, PstI-BglIII, HindIII-BamHI) i tilsvarende delte M13mp8 eller M13mp9 vektorer. Videre delsekvenser fikk man idet det 2,0 kb lange BamHI-BglIII-fragment, hhv. det 2,0 kb lange PstI-fragment ble klonet etter "shotgun-metoden" i M13mp8-vektoren.

De beholdte delsekvensene ble forenet ved hjelp av et computerprogram til den 4664 bp lange totalsekvens som er vist på fig. 1.

Ved computerunderstøttet analyse av de åpne leserammene og sammenligning med gamma-interferongener fra andre arter (Gray og Goeddel, Nature 298: 859-863; Gray og Goeddel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5842-5846, 1983; Dijkema et al., EMBO J. 4: 761-767, 1985; Cerretti et al., J. Immunology 136: 4561-4564, 1986) ble det proteinkodende området av det equine gamma-interferon-genet bestemt. Det proteinkodende området er avbrutt av tre introner, hvorunder det 20 aminosyre-lange, hydrofobe signalpeptid og 18 aminosyrer av det ferdige EqIFN-

gamma kodes i det første ekson (base 366 -479). Det andre ekson koder for aminosyrene 19-41 (base 1639-1707), det tredje ekson koder for aminosyrene 42-102 (base 1808-1985), det fjerde ekson koder for karboksy-enden med aminosyrene 103-146 (base 3307-3441). I posisjonene 4010 og 4020 befinner det seg to signalsekvenser (AATAAA) for polyadenyleringen av mRNA. I posisjonene 86-88 av det ferdige EqIFN-gamma befinner det seg det eneste potensielle N-glykosyleringssted (ASN-Ser-Ser), som faller sammen med det andre N-glykosyleringsstedet til storfe-gamma-interferon (Asn-Gly-Ser) (Fig. 2). Det ferdige EqIFN-gamma inneholder overraskende bare en eneste cysteinrest i stilling 3, hvorunder analogt med de naturlige humane og muse-gamma-interferoner sansynligvis de første tre aminoternale aminosyrer (i dette tilfellet Tyr-Tyr-Cys) avspaltes proteolytisk i kroppen.

For å eksprimere rekombinant EqIFN-gamma i sin ferdige form i *Escherichia coli*, ble et syntetisk gen konstruert fra oligonukleotidet. Det koder for den samme aminosyresekvens som det naturlige EqIFN-gamma, men inneholder utelukkende slike kōdoner for de enkelte aminosyrer som anvendes i høyt eksprimerte, celle-egne gener av *E.coli* (Gouy og Gautier, *Nucl. Acids Res.* 10: 7055-5074, 1982). I tillegg ble flere singulære restriksjons-enzym-spaltningsteder innbygget, som muliggjør en enkelt manipulering av genet for forandring av de enkelte avsnitt. Det syntetiske genet for EqIFN-gamma ble konstruert i to varianter fra tilsammen 16 forskjellige oligonukleotider. Den første varianten koder for ferdig EqIFN-gamma med 146 aminosyrer pluss start-metionin, den andre formen for et polypeptid forkortet med 3 aminosyrer (Tyr-Tyr-Cys) på amino-enden pluss startmetionin, som antagelig kunne opptre i den naturlige organisme.

Strukturen til det syntetiske EqIFN-gamma-gen er vist i fig. 3. Oligonukleotidet som anvendes for fremstillingen ble syntetisert ved hjelp av en Applied Biosystems Model 381A DNA-syntetisator, renses ved elektroforese og avsaltet. Oligonukleotidene som er karakterisert i fig. 3 har følgende struktur:

- EG-1 5'-TACTACTGCC AGGCTGCTTT CTTTAAAGAA ATCGAAAACC TGAAAGAATA
CTTCAACGCT CG-3'
- EG-2 5'-TTGAAGTATT CTTTCAGGTT TTCGATTCT TTAAGAAAG CAGCCTGGCA
GTAGTA-3'
- EG-3 5'-TAACCCAGAC GTTGGTGACG GTGGTCCGCT GTTCCTGGAC ATCCTGAAAA
ACTGGAAAAGA AACTCTG-3'
- EG-4 5'-TTCTTCCAG TTTTTCAGGA TGCCAGGAA CAGCGACCA CCTCACCAA
CGTCTGGGT ACAGCG-3'
- EG-5 5'-ACAAAAAGAT CATCCAGTCT CAGATCGTTT CTTTCTACTT CAAACTGTTC
GAAAACCTGA AAGACAACC-3'
- EG-6 5'-TTTCAGGTTT TCGAACAGTT TGAAGTAGAA AGAAACGATC TGAGACTGGA
TGATCTTTT STCAGAGTC-3'
- EG-7 5'-AGGTTATCCA GAAATCGATG GACACTATCA AAGAAGATCT GTTCGTAAA
TTCTTCAACT CG-3'
- EG-8 5'-TCSACGATG GAAGAATTTA ACGAACAGAT CTTCTTTGAT AGTGTCCATC
SATTCTGGA TAACCTGGT GTC-3'
- EG-9 5'-TCGACTTCTA AACTGGAAGA CTTCCAGAAA CTGATCCAGA TCCCAGTTAA
CGACCTGAAA-3'
- EG-10 5'-GCTGAACTTT CAGGTCGTTA ACTGGGATCT GGATCAGTTT CTGGAAGTCT
TCCAGTTAG AAG-3'
- EG-11 5'-GTTCAGCGTA AGGCATCTC TGAAGTATC AAAGTTATGA ACGACCTGTC
TCCAAAAGCT AA-3'
- EG-12 5'-CGCAGGTTAG CTTTTGAGA CAGGTCGTTT ATAAGTTGA TCAGTTCAGA
GATAGCCTTA C-3'
- EG-13 5'-CCTGCGTAAA CGTAAACGTT CTCAGAACC ATTCCGTGGT CGTCGTGCTC
TTCAGTAAG-3'
- EG-14 5'-GATCCTTACT GAAGAGCACG ACGACCACGG AATGGGTTCT GAGAAGGTT
ACGTTA-3'
- EG-15 5'-CAGGCTGCTT TCTTTAAGA AATCGAAAAC CTGAAAGAAT ACTTCAACGC TCG-3'
- EG-16 5'-TTGAAGTATT CTTTCAGGTT TTCGATTCT TTAAGAAAG CAGCCTG-3'

Sammenbygningen av det syntetiske EqIFN-gamma genet fant sted i to avsnitt. Den første del av genet ble fremstilt ved hjelp av de åtte oligonukleotider EG-1 til EG-8 inntil Sali-spaltningsstedet, den andre halvparten av genet av de seks oligonukleotider EG-9 til EG-14 av Sali-spaltningsstedet til BamHI-spaltningsstedet. For den form av EqIFN-gamma som på amino-enden var forkortet med tre aminosyrer anvendtes i stedet for oligonukleotidene EG-1 og EG-2 oligonukleotidene EG-15 og EG-16.

I oppfinnelsen anvendes ikke bare gen-sekvenser som kodes spesifikt for interferonene ifølge oppfinnelsen, men likeledes modifikasjoner som kan oppnås lett og rutinemessig ved mutasjon, nedbygging, transposisjon eller addisjon. Enhver sekvens som koder for interferonene som fremstilles ifølge oppfinnelsen (d.v.s. har det biologiske aktivitets-spektrum som her er beskrevet) og i sammenligning med de viste er degenerert, er likeledes innbefattet; fagfolk på dette området er i stand til å degenerere DNA-sekvenser av de kodende områder. Likeledes er hver sekvens som koder for et polypeptid med aktivitets-spekteret til interferonene fremstilt ifølge oppfinnelsen, og som hybridiserer med de viste sekvenser (eller deler derav) under stringente betingelser (f.eks. betingelser som selekterer for mer enn 85 %, fortrinnsvis mer enn 90 % homologi) innbefattet.

Hybridiseringene utføres i 6xSSC/5x Denhardt's løsning/0,1 % SDS ved 65°C. Stringensgraden fastlegges i vaske-trinnet. Således er betingelsene for en seleksjonering på DNA-sekvenser med ca. 85 % eller mer homologi 0,2xSSC/0,01 % SDS/65°C egnet, og for en seleksjonering på DNA-sekvenser med ca. 90 % eller mer homologi betingelsene 0,1x SSC/0,01 % SDS 65°C.

I oppfinnelsen kan interferon-gener innføres under betingelser i enhver organisme som fører til høye utbytter. Egnede verter og vektorer er velkjent for en fagmann; som eksempel henvises til EP-A-0.093.619.

Spesielt foretrekkes prokaryoter for ekspresjonen, f.eks. E.coli K 12, stamme 294 (ATCC nr. 31 446) eller E.coli X1776

(ATCC nr. 31 537). I likhet med de forannevnte stammer kan også E.coli W 3110 (F⁻ Lambda⁻ Prototrof, ATCC nr. 27325), basiller så som Bacillus subtilis og andre enterobacteriaceae så som Salmonelle typhimurium eller Serratia marcescens og forskjellige Pseudomonader anvendes.

Generelt kan plasmid-vektorer som inneholder kontroll-sekvenser som stammer fra arter, hvilke er kompatible med vertscellene, anvendes i forbindelse med disse arter. Vektoren inneholder normalt ved siden av et replikasjonssete gjenkjennelses-sekvenser som gjør det mulig å selektere de transformerte cellene fenotypisk. For eksempel transformeres E.coli normalt med pBR322, et plasmid som stammer fra E.coli-arter (Bolivar, et al., Gene 2, 95 (1977)). pBR322 inneholder gener for ampicillin- og tetracyclin-resistens og byr dermed på muligheten til å identifisere transformerte celler. pBR322-plasmidet eller også andre plasmider må dertil i seg selv inneholde promotorer eller må utstyres med promotorer som kan anvendes av den mikrobielle organisme for ekspresjon av sine egne proteiner. Promotorene som anvendes oftest ved fremstilling av rekombinant DNA, inneholder Beta-Lactamase-(Penicillinase) og Lactose-Promotor-systemene (Chang et al., Nature 275, 615 (1978); Itakura et al., Science 198, 1056 (1977); Goeddel et al., Nature 281, 544 (1979)) og Tryptofan (trp) promotor-systemene (Goeddel et al., Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980); EP-A-0.036.776). Ved siden av disse spesielt anvendelige promotorer er også andre mikrobielle promotorer utviklet og benyttet. Gen-sekvensen for interferonene som fremstilles ifølge oppfinnelsen kan f.eks. anvendes under kontroll av Leftward-promotoren til bakteriofagen Lambda (P_L). Denne promotoren er en spesielt effektiv styrbar promotor. Styringen muliggjøres gjennom lambda-repressoren fra hvilket nabostående restriksjons-skjæringsstedet er kjente. Et temperatur-ømfintlig allel av dette repressor-genet kan tas inn i en vektor som inneholder 1 EqIFN-gamma-sekvens. Når temperaturen økes til 42°C, inaktiveres repressoren og promotoren aktiveres. Ved anvendelse av dette systemet er det mulig å etablere en klonbank, i hvilken en funksjonell IFN-

sekvens plasseres i nærheten av et ribosom-bindingssted i varierende avstander til Lambda-P_L-promotoren. Disse kloner kan så undersøkes og det med det høyeste utbytte selekteres.

Ekspresjonen og translasjonen av en sekvens som koder for proteinene som fremstilles ifølge oppfinnelsen kan også forløpe under kontroll av andre reguleringssystemer som gjelder som "homologe" til organismen i sin ikke transformerte form. Således inneholder f.eks. kromosomalt DNA fra en laktose-avhengig E.coli et laktose eller lak-operon, som ved utskillelse av enzymet β -galactosidase muliggjør laktose-nedbrytningen.

Lak-kontroll-elementene kan erholdes fra bakteriofagen Lambda-plac5, som kan infisere E.coli. Fagens lak-operon kan stamme fra transduksjonen fra de samme bakterietyper.

Reguleringsystemer som kan finne anvendelse i fremgangsmåten ifølge oppfinnelsen, kan også stamme fra plasmid-DNA, som er eget for organismen. Lak-promotor-operator-systemet kan induseres med IPTG.

Andre promotor-operator-systemer eller deler derav kan like godt anvendes: F.eks. arabinose-operator, Colicine E₁-operator, galaktose-operator, alkalisk fosfatase-operator, trp-operator, xylose-A-operator, tac-promotor og lignende.

I tillegg til prokaryoter kan også eukaryotiske mikroorganismer så som gjærkulturer anvendes. Saccharomyces cerevisiae er den mest anvendte av de eukaryotiske mikroorganismer, skjønt en rekke andre arter er alminnelig tilgjengelig. For ekspresjon i Saccharomyces anvendes f.eks. plasmidet YRp7 (Stinchcomb et al., Nature 282, 39 (1979); Kingsman et al., Gene 7, 141 (1979); Tschumper et al., Gene 10, 157 (1980)) og plasmidet YEpl3 (Bwach et al., Gene 8, 121-133 (1979)). Plasmidet YRp7 inneholder TRP1-genet, som gir en seleksjons-markering for en gjærmutant som er ute av stand til å vokse i tryptofanfritt medium, f.eks. ATCC nr. 44076.

Tilstedeværelsen av TRP1-skaden som karakteristiskum for gjær-verts-genomet gir da et virksomt hjelpemiddel for å påvise transformasjon når man dyrker uten tryptofan. Helt lignende forholder det seg ved plasmidet YEpl3, som inneholder

gjær-genet LEU-2, som kan anvendes for komplettering av en LEU-2-minus-mutant. Egnede promotor-sekvenser for gjærvektorer inneholder det 5'-flankerende området til genet for ADH I (Ammerer G., *Methods of Enzymology* 101, 192-201 (1983)), 3-fosfoglycerat-kinase (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255, 2073 (1980)) eller andre glykolytiske enzymer (Kawaski og Fraenkel, *BBRC* 108, 1107-1112 (1982)) så som enolase, glycerol-aldehyd-3-fosfat-dehydrogenase, heksokinase, pyruvat-dekarboksylase, fosfofruktokinase, glukose-5-fosfat-isomerase, fosfo-glukose-isomerase og glukokinase. Ved konstruksjonen av egnede ekspresjonsplasmider kan avslutnings-sekvensene i forbindelse med disse genene likeledes innsettes i ekspresjonsvektoren på 3'-enden av sekvensen som skal eksprimeres for å muliggjøre polyadenylering og avslutning av mRNA-et.

Andre promotorer som dertil har fordelene av transkripsjon kontrollert ved vekst-betingelser, er promotor-områdene til genet for alkohol-dehydrogenase-2, isocytokrom C, syre-fosfatase, nedbrytende enzymer som henger sammen med nitrogen-metabolismen, den ovenfor nevnte glycerolaldehyd-3-fosfat-dehydrogenase og enzymer som er ansvarlig for behandlingen av maltose og galaktose. Promotorer som reguleres ved gjær "Mating Typ Locus", f.eks. promotorer for genene BARI, MF01, STE2, STE3, STE5, kan anvendes ved temperatur-regulerte systemer ved anvendelsen av temperatur-avhengige sir mutasjoner. (Rhine Ph.D. Thesis, University of Oregon, Eugene, Oregon (1979), Herskowitz og Oshima, *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*, part I, . 181-209 (1981), Cold Spring Harbor Laboratory). Disse mutasjoner påvirker ekspresjonen av de hvilende "mating-typ" kassetter hos gjær og derved indirekte de "mating-typ" avhengige promotorer. Generelt er imidlertid enhver plasmid-vektor som inneholder en gjær-kompatibel promotor, originære replikasjons- og avslutnings-sekvenser egnet.

I tillegg til mikroorganismer er kulturer av flercellede organismer likeles egnede vertsorganismer. I prinsippet kan enhver av disse kulturer anvendes, enten den er av virveldyr-

eller virvelløse dyrekulturer. Størst interesse består likevel for virveldyr-celler, slik at formeringen av virveldyr-celler i kultur (vevskultur) i de senere år ble til en rutinemessig metode (Tissue Culture, Academic Press, Kruse and Patterson, Editors (1973)). Eksempler på slike nyttige vertscellelinjer er VERO- og HeLa-celler, CHO-celler og WI38, BHK, COS-7 og MDCK-cellelinjer. Ekspresjonsvektorer for disse celler inneholder normalt (om nødvendig) et replikasjonsstartpunkt, en promotor, som befinner seg foran genet som skal eksprimeres, sammen med alle nødvendige ribosombindingssteder, RNA-spleisings-sted, polyadenyleringssted og transkripsjonelle avslutnings-sekvenser.

Ved anvendelsen i pattedyrceller stammer kontroll-funksjonene på ekspresjonsvektorene ofte fra virusmateriale. F.eks. stammer de vanlig anvendte promotorer fra Polyoma Adenovirus 2, og spesielt ofte fra Simian Virus 40 (SV 40). De tidlige og sene ende-promotorer av SV 40 er spesielt nyttige, da begge er lette å få fra viruset som fragment, som også inneholder det virale replikasjonsstedet til SV 40. (Fiers et al., Nature 273, 113 (1978)). Også mindre og større fragmenter av SV 40 kan anvendes, forutsatt at de inneholder den tilnærmet 250 bp lange sekvens som rekker fra HindIII-skjæringsstedet til BglII-skjæringsstedet i det virale replikasjonsstartpunkt. Dertil er det likeledes mulig og ofte anbefalelsesverdig å anvende promotor- eller kontroll-sekvenser som normalt er knyttet til de ønskede gen-sekvenser, forutsatt at disse kontrollsekvenser er kompatible med vertscelle-systemene.

Et replikasjonsstartpunkt kan enten anbringes ved en tilsvarende vektorkonstruksjon for å bygge inn et eksogent startpunkt, f.eks. fra SV 40 eller andre viruskilder (f.eks. polyoma, adeno, VSV, PBV, osv.) eller kan anbringes gjennom de kromosomale replikasjonsmekanismene til vertscellen. Integrerer vektoren i vertscellekromosomet, er det sistnevnte tiltaket som regel tilstrekkelig.

Fortrinnsvis kan DNA-sekvensen også eksprimeres i ekspresjonsplasmidet pER103 (E. Rastl-Dworkin et al., Gene 21,

237-248 (1983) og EP-A-0.115-613 - deponert hos DSM under nummer DSM 2773 den 20 desember 1983) i plasmidet parPER33 (EP-A-0.115-613) eller plasmidet pRH100, da disse vektorer alle inneholder regulerings-elementer som fører til en høy ekspresjonsgrad av det klonede gen. I oppfinnelsen anvendes plasmidet pRH100 som ekspresjonsvektor for det syntetiske EqIFN-gamma, som inneholder den regulerbare tryptofan-promotor fra *Serratia marcescens* og en kunstig ribosom-bindings-sted. For fremstilling av ekspresjonsplasmid pRH100 ble plasmidet pER103 (Eva Dworkin-Rastl et al., Gene 21 (1983) 237-248, EP-A-0.115.613) lineærisert med restriksjonsendonukleasen HindIII og de 5'-terminale fosfatrester fjernet.

Disse plasmid-DNA ble blandet og ligert med de fosfor-ylerte oligonukleotider d(AGCTTAAAGATGAGCT) og d(CATCTTTA). Ligase-reaksjonen ble foretatt med restriksjonsendonukleasen SacI og ligert ved tilsetning av T4-PNK. Oligonukleotidene ble fremstilt analogt med den metode som er beskrevet i EP-A-0.115.613. Kompetente *E.coli* HB101 ble blandet med denne ligase-reaksjonen og inkubert. Fra de dannede bakterie-kolonier ble 12 plukket ut vilkårlig og plasmidene isolert fra dem i mikromålestokk (Birnboim og Doly, Nucl. Acids. Res. 7 (1979) 1513-1523). De resulterende DNA'er ble kappet med restriksjonsendonukleasen SacI og DNA'ene separert på en agarosegel (1 %, 1x TBE-buffer). Vandringen av DNA som lineært molekyl med størrelse fra ca. 4.400 bp bekreftet innføringen av et SacI-erkjennelsessted i plasmidet. Et av disse plasmider ble plukket ut vilkårlig. Med DNA fra det tilhørende minipreparat transformerte man igjen *E.coli* HB101. Fra de resulterende transformerte bakterier ble en koloni valgt ut og dyrket i større målestokk. Plasmidet som ble isolert fra dette ble kappet med restriksjonsendo-nukleasene EcoRI og BamHI, DNA'et separert på en 1 %ig agarosegel, og det mindre fragment isolert fra gelen ved elektroeluering. Dette ca. 460 bp lange EcoRI-BamHI DNA-fragment ble sekvensbestemt etter Sanger. (F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1977) 5463-5467). Den således analyserte plasmidet ble kalt pRH100.

Plasmidet ble kappet fullstendig med SacI, og de

overhengende DNA-endene ble gjort rette ved behandling med Klenow-fragment (Amersham) i nærvær av alle fire desoksy-nukleotidtrifosfater. Reaksjonen stoppes ved fenol/kloroform-ekstraksjon, og DNA konsentreres ved etanolfelling. Gjennom denne behandlingen oppstår i tilknytning til tryptofan-promotoren en butt DNA-ende, som ender med translasjons-startkondonet "ATG". De lineæriserte plasmid-DNA'er etterkappes med BamHI og vektordelen isoleres.

Den derved forberedte pRH100-plasmid-vektoren blandes med de ligerte oligonukleotider EG-1 til EG-8 og EG-9 til EG-14 og inkuberes i ligeringsbufferen med T4 DNA-ligase. E.coli som er gjort kompetent, fortrinnsvis JM101, transformeres med denne ligeringsblandingen og inkuberes natten over. Fra de oppnådde transformanter isoleres plasmid-DNA i miniprepareringsmetoden og strukturen bestemmes ved restriksjonsanalyse og sekvensbestemmelse av HindIII-BamHI-innskuddet. Et plasmid med den ønskede struktur for ekspresjonen av ferdig EqIFN-gamma kalles pEqG-YYC1. På fullstendig analog måte kloner oligonukleotidene EG-15, 16 EG-3 til EG-8 og EG-9 til EG-14 i pRH100-vektoren for å oppnå EqIFN-gamma som er forkortet med tre aminosyrer. Et plasmid med den ønskede struktur kalles pEqG-QAAl.

Transformasjon av cellene med bærerne kan oppnås ved mange metoder. For eksempel kan den skje ved kalsium, hvorunder enten cellene vaskes i magnesium og DNA'et tilsettes cellene oppslemmet i kalsium, eller cellene utsettes for en samfelling av DNA og kalsiumfosfat. Etterfølgende gene-ekspresjon overføres cellene til medier som selekterer for transformerte celler.

For påvisning av ekspresjonen av interferonaktivitet i E.coli JM101 som inneholder plasmidet pEqG-YYC1 eller pEqG-QAAl brytes bakteriene opp etter inkubasjonen i egnet kulturmedium og supernatanten prøves etter sterilfiltrering med hensyn til interferonaktivitet i en måling som måler den cytopatiske virkning (CPE) av VSV eller EMCV. Dertil anvendes NBL-6 celler (ATCC CCL 57 hestehud-epidermisk-celler) for dette som var blitt infisert med vesikulær-stomatitis-virus

(VSV) og/eller A549 (ATCC CCL185, human lungekarcinom-cellelinje) som var blitt infisert med encefalomyacardit virus (EMCV).

Påvisningen av de eksprimerte heste-interferoner oppnås ved markering av proteinene i maksiceller. Plasmidkodete proteiner kan markeres ved anvendelse av maksicelleteknikk (Sancar, A. et al., J. Bacteriol, 137, 692-693 (1979) in vivo. E.coli stamme CSR603 (CGSC 5830) har ingen mekanisme for reparasjon av skader i DNA som er oppstått ved UV-bestråling. Ved bestråling med en egnet UV-stråledose ødelegges det bakterielle kromosom, men noen av de vesentlig mindre plasmid-DNA'er som er tilstede i flere kopier pr. celle forblir derimot funksjonelle. Etter at alle ikke-skadede celler som formerer seg med antibiotikumet D-cykloserin er drept og det endogene mRNA er brutt opp, transkriberes og translateres i de gjenværende celler bare gener som er kodet på plasmidet. De dannede proteiner kan markeres radioaktivt og påvises ved innbygging av ³⁵S-metionin. E.Coli CSR603 transformeres etter vanlige metoder med ekspresjons-plasmidene og seleksjoneres på ampisillinholdige agarplater med hensyn til transformerte bakterier. Prepareringen av maksicellene og markeringen av proteiner skjer etter forskriften til A. Sancar. Som molekylvekt-standard anvendes en ¹⁴C-metyllert proteinblanding (Amersham). Som kontroller anvendes plasmidet pER103, som bare inneholder promotoren uten interferongen og plasmidet PER21/1, som inneholder to kopier av det humane IFN- α 2arg genet.

For karakterisering av produktene fremstilt ifølge oppfinnelsen er de kjente biologiske og immunologiske målinger for interferoner egnet. Da både IFN- α , - β og -gamma er typiske for antivirusegenskapene som fastslås i PFU- og CPE-målingene, utnyttet for å skille mellom de ifølge oppfinnelsen frembragte EqIFN-gammaer av EqIFN- α og/eller - β - den forskjellige antigeniteten til interferonene.

Polypeptidene fremstilt ifølge oppfinnelsen nøytraliseres ikke av antisera mot EqIFN- α og/eller EqIFN- β . Som videre forskjells-kriterium anvendes syrelabiliteten til poly--

peptidene fremstilt ifølge oppfinnelsen, samt sensitiviteten overfor natriumdodecylsulfat (SDS). Både inkuberingen ved 0,2 %ig SDS-løsning og inkubasjonen av polypeptidene ved pH2 gjennom flere timer ved 4°C fører til et nesten fullstendig tap av antivirus-aktivitet. EqIFN- α og EqIFN- β er stabile under de samme betingelser.

For påvisning av totalantallet av sekvenser i hestegenom som har høy homologi med interferongenet, spaltes høymolekylære heste-DNA fullstendig med de tilsvarende restriksjonsenzymmer, og disse kappede DNA separeres etter størrelsen. Etter Southern-overføring på nitrocellulose-filtre, denaturering og fiksering av DNA hybridiseres hvert filter med nicktranslatert probe. Som probe for EqIFN-gamma anvendes et fragment fra plasmidet pEqG-YYC1 som inneholder den kodende sekvens for hele det ferdige interferon. Filteret vaskes så under stringente betingelser. Autoradiografi finner sted på DuPont Cronex røntgen film under anvendelse av Kodak Lanex-Regulær forsterkerfolie 7 dager ved -80°C.

Etter ferdig transformasjon av verten, ekspresjon av genet og fermentering eller celledyrking under betingelser ved hvilke de foreliggende proteiner eksprimeres, kan produktet normalt ekstraheres ved kjente kromatografiske separasjonsmetoder så man får et materiale som inneholder proteinene med eller uten leder- og hale-sekvenser. Interferonene fremstilt ifølge oppfinnelsen kan eksprimeres med en leder-sekvens på N-enden (Pre-IFN), som kan fjernes fra noen vertsceller. Ellers er en avspaltning av leder-polypeptidet (når det foreligger) nødvendig for å oppnå ferdig IFN. Alternativt kan IFN-klonet modifiseres slik at det ferdige protein produseres direkte i mikroorganismen istedet for Pre-IFN. For dette tilfelle kan forstadie-sekvensen til gjær-"mating"-feromonet MF-alfa-1 anvendes for å gi en riktig "modning" av det fusjonerte protein og utskillelse av produktene i vekstmediet eller i det periplasmiske rom. DNA-sekvensen for funksjonelt eller ferdig IFN kan forbindes med MF-alfa-1 på det formodede katepsi-lignende skjæringssted (etter Lys-Arg) på posisjon 256 fra initieringskododnet ATG (Kurjan, Herskowitz, Cell 30, 933-943

(1982)).

En fremgangsmåte etter hvilken EqIFN-gamma f.eks. fra bakterier kan renses, er beskrevet i det følgende generelle skjema.

1. Ekstraksjon av celler i en lysebuffer (ca. pH 8) med høy ledningsevne ved hjelp av passasje gjennom en homogenisator ved høyt trykk; avkjøling av strømmen ut i et isbad.
2. Utfelling av DNA ved tilsetning av polyetylenimin under røring f.eks. ved 4°C.
3. pH-utfelling av de bakterielle proteiner hvorunder EqIFN-gamma forblir i løsning.
4. Frasentrifugering av de faste stoffer ved 4°C.
5. Konsentrering av supernatanten (etter fornyet innstilling av pH) f.eks. ved ultrafiltrering.
6. Dialyse av konsentratet mot en buffer med lav ledningsevne.
7. Frasentrifugering av faststoffene, hvorunder EqIFN-gamma forblir i løsning.
8. Ionebytter-kromatografi på karboksymetyl-cellulose, eluering med en gradient med tiltagende ionestyrke.
9. Kromatografi på kalsiumfosfat-gel og eluering med en gradient med tiltagende ionestyrke.
10. Ionebytter-kromatografi på karboksymetyl-cellulose under svak denaturerende betingelser og eluering med en gradient med tiltagende ionestyrke.
11. Separasjon ved gelfiltrerings-kromatografi.

Den nevnte fremgangsmåte muliggjør produktutbytter med en renhet på mer enn 95 %.

Det skal her nevnes at ved de foreliggende interferoner dreier det seg ikke om interferoner som er beskrevet i detalj, men likeledes om alle modifikasjoner av disse polypeptider som ikke vesentlig forandrer heste-gamma-IFN-aktiviteten. Disse modifikasjoner innbefatter f.eks. forkortelse av molekylet,

f.eks. på N- eller C-terminale ender, utskifting av aminosyrer og andre rester, kjemiske eller biokjemiske bindinger av molekylet til andre molekyler som er inerte eller aktive. Ved de sistnevnte modifikasjoner kan det f.eks. dreie seg om hybrid-molekyler fra et eller flere interferoner fremstilt ifølge oppfinnelsen og/eller kjente α - eller β -interferoner.

På grunn av sitt biologiske virknings-spektrum er de nye, foreliggende interferoner anvendelige for enhver behandlingsform som også de kjente interferoner kan anvendes for. Disse omfatter f.eks. herpes, rhinovirus, heste-abort-virus, forskjellige kreftformer o.l. De nye interferoner kan anvendes alene eller i kombinasjon med andre interferoner eller biologiske aktive produkter, f.eks. med IFN-alfa, IL-2, andre immun-modulatorer og lignende.

Interferoner fremstilt ifølge oppfinnelsen kan gis parallelt i tilfeller hvor anti-tumor- eller anti-virus-behandling er nødvendig, og i tilfeller hvor immuno-undertrykkende egenskaper viser seg. Dose og doseringshyppighet kan være lignende dem som for tiden gjelder ved kliniske undersøkelser for IFN-materialer, f.eks. ca. $(1-10) \times 10^6$ enheter daglig og ved preparater som er mer enn 1 % rene, opptil f.eks. 5×10^7 enheter daglig.

For en hensiktsmessig doseringsform ved et i det vesentlige homogent, bakterielt produsert IFN ifølge oppfinnelsen, løses f.eks. ved parenteral anvendelse 3 mg EqIFN-gamma i 25 ml 5 %ig animalsk serumalbumin, fortrinnsvis heste/hunde-serumalbumin. Denne løsningen føres så gjennom et bakteriologisk filter, og den filtrerte løsning fordeles aseptisk på 100 flasker, hvorav hver inneholder 6×10^6 enheter rent IFN egnet for parenteral anvendelse. Glassene oppbevares før anvendelse fortrinnsvis kaldt (-20°C). Forbindelsene fremstilt ifølge oppfinnelsen kan formuleres på kjent måte så man får farmasøytiske anvendelige midler, hvorunder polypeptidet blandes med en farmasøytisk akseptabel bærersubstans. Brukbare bærere og deres formulering er f.eks. beskrevet i E.W. Martin i Remington's Pharmaceutical Sciences, som det her henvises til. Interferonene fremstilt ifølge

oppfinnelsen blandes med en tilmålt mengde av bærerstoffet for å frembringe egnede farmasøytiske midler som er egnet for en effektiv anvendelse hos mottageren (pasienten). Fortrinnsvis foretas en parenteral applikasjon.

Videre kan monoklonale antistoffer dannes mot polypeptidene fremstilt ifølge oppfinnelsen med hybridomaceller som produserer slike antistoffer. Fortrinnsvis er hybridomacellelinjene og de monoklonale antistoffer som utskilles av disse dem som reagerer spesifikt med EqIFN-gamma. Fremgangsmåten for fremstilling av slike monoklonale antistoffer er karakterisert ved at man immuniserer små pattedyr, f.eks. kaniner eller mus med polypeptidene fremstilt ifølge oppfinnelsen, fusjonerer B-lymfocytter av slike immuniserte dyr med myeloma-celler, kloner de dannede hybridomaceller, deretter dyrker in vitro eller ved injeksjon i mus og isolerer antistoffer fra kulturene.

Disse kan brukes som immuno-affinitets-kromatografisøyler og forsøkssett for immunologiske målinger.

Ved fremstilling av antistoffene immuniseres mus, f.eks. Balb/c-mus på i og for seg kjent måte. I en foretrukket utførelsesform injiseres polypeptidene fremstilt ifølge oppfinnelsen ca. ukentlig eller også med større avstand i flere måneder, f.eks. 5 - 12 uker, inntil et tilstrekkelig antall antistoff-produserende B-lymfocytter er dannet.

Organer som inneholder B-lymfocytter, f.eks. miltceller, tas ut fra de immuniserte mus og fusjoneres med slike myelomaceller som ikke vokser i et selektivt dyrkningsmedium p.g.a. en mutasjon. Slike myelomaceller er kjente og er f.eks. dem med betegnelsen X63-Ag8, X63-Ag8.6.5.3, MPC-11, NS1-Ag4/1, MOPC-21 NS/1 eller SP 2/0. I en foretrukket utførelsesform fusjoneres miltceller fra immuniserte mus med myelomaceller av cellelinjen X63-Ag8.6.5.3. Fusjonen utføres etter i og for seg kjente metoder ved blanding av B-lymfocyttene og myelomacellene under tilsetning av et celle-fusjons-reagens så som polyetylen glykol, Sendai-virus, kalsiumklorid eller lysolecitin. Fortrinnsvis fusjonerer man i nærvær av polyetylen glykol, f.eks. med en molekylvekt mellom 1000 og

4000. Etter fusjonen dyrkes de dannede hybrider ved en i og for seg kjent fremgangsmåte i et selektivt dyrkningsmedium, som er komplementert med hypoksantin, aminoterin og tymidin (HAT-medium). Ikke fusjonerte myeloma-celler kan ikke vokse i dette medium og dør i likhet med normale lymfocytter.

Supernatanten av hybridoma-kulturen kan prøves med hensyn til innhold av spesifikke antistoffer ved i og for seg kjente metoder, f.eks. ved radio-immunologisk måling eller agglutineringsmetode. Hybridomacellene som produserer antistoffer med den ønskede spesifitet seleksjoneres ut fra blandingen som er oppstått ved fusjoneringen av forskjellige hybridomaceller ved kloning. For dette anvender man en i og for seg kjent fremgangsmåte som kalles "limiting dilution", kulturer ut fra en enkelt voksende celle.

For masseproduksjon dyrkes hybridoma-celleklonene som produserer antistoffer med den ønskede spesifitet, enten i, i og for seg kjente medier in vitro eller injiseres i mus for formering. I en foretrukket utførelsesform injiseres hybridoma-cellene i mus som er forbehandlet med Pristan, aszites-væske tas ut og derfra isoleres antistoffer ved felling med ammonium-sulfatløsning.

De spesifikke antistoffer som er oppnådd ved hjelp av disse hybridomaceller kan på i og for seg kjent måte anvendes for fremstilling av immuno-affinitets-kromatografi-søyler. I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsen blandes et egnet bærermateriale (oppslemmet i en bufferløsning) med en antistoff-løsning, ubundede andeler vaskes deretter ut og ubesatte steder på bærer materialet blokkeres. Antistoffene kan også anvendes i terapi.

De spesifikke antistoffer som oppnås ved hjelp av hybridoma-cellene kan på i og for seg kjent måte anvendes for fremstilling av forsøkssett. Disse forsøkssett kan bygge på forskjellige metoder, f.eks. på radio-immunologisk måling, Latex-agglutineringsmetode, "Tüpfel"-forsøk, kompetitiv eller Sandwich-radio-immunologisk måling, enzymatisk immunologisk måling, immuno-fluorescens eller immunokjemiske enzym-prøver.

Ved hjelp av oppfinnelsen tilveiebringes:

Polypeptider i vesentlig ren form

- med de biologiske og immunologiske egenskapene til heste-interferon-gamma (EqIFN-gamma)
- i det vesentlige fri for andre proteiner av animalsk opprinnelse;
- uten naturlig glykosylering;
- har aminosyren metionin foran den 1. aminosyren til N-enden;
- inneholder et lederpeptid;
- inneholder aminosyresekvensen

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

eller

					Gln	Ala	Ala	Phe	Phe	Lys	Glu	Ile	Glu	Asn	Leu	Lys
Glu	Tyr	Phe	Asn	Ala	Arg	Asn	Pro	Asp	Val	Gly	Asp	Gly	Gly	Pro		
Leu	Phe	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Asn	Trp	Lys	Glu	Asp	Ser	Asp	Lys		
Lys	Ile	Ile	Gln	Ser	Gln	Ile	Val	Ser	Phe	Tyr	Phe	Lys	Leu	Phe		
Glu	Asn	Leu	Lys	Asp	Asn	Gln	Val	Ile	Gln	Lys	Ser	Met	Asp	Thr		
Ile	Lys	Glu	Asp	Leu	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Asn	Ser	Ser	Thr	Ser		
Lys	Leu	Glu	Asp	Phe	Gln	Lys	Leu	Ile	Gln	Ile	Pro	Val	Asn	Asp		
Leu	Lys	Val	Gln	Arg	Lys	Ala	Ile	Ser	Glu	Leu	Ile	Lys	Val	Met		
Asn	Asp	Leu	Ser	Pro	Lys	Ala	Asn	Leu	Arg	Lys	Arg	Lys	Arg	Ser		
Gln	Asn	Pro	Phe	Arg	Gly	Arg	Arg	Ala	Leu	Gln	***					

Eksempelvis er de rekombinante DNA-molekyler innsatt i plasmidene pAH111, pRH281/5, pRH282/5, pGN1, pGN3, pGN20, pEqG-QAA2 eller pEqG-QAA3.

Vertsorganismene er fortrinnsvis transformert med en av de ovenfornevnte rekombinante vektorer og velges fra, f.eks. prokaryoter, fortrinnsvis E.coli, spesielt E.coli JM101 eller HB101, eukaryoter, f.eks. Saccharomyces cerevisiae eller pattedyrceller, fortrinnsvis hestecellelinjer.

Polypeptidene fremstilt ifølge oppfinnelsen kan anvendes for terapeutisk behandling og/eller for immunisering eller for fremstilling av farmasøytiske preparater.

De forut nevnte monoklonale antistoffer kan anvendes for terapi og/eller for kvalitativ og/eller kvantitativ bestemmelse av et av polypeptidene fremstilt ifølge oppfinnelsen, samt for rensning av polypeptidene fremstilt ifølge oppfinnelsen.

Et prøvesett for bestemmelse av polypeptidene fremstilt ifølge oppfinnelsen vil inneholde de ovenfor nevnte monoklonale antistoffer.

Forklaring på figurene:

Figur 1: DNA-sekvens av den 4664 bp lange BamHI-fragment fra Lambda Eq-gamma2. Den kodete aminosyresekvens og intronets stilling er angitt. Negativt numerert aminosyrer angir det hydrofobe signalpeptidet. Det eneste potensielle N-glykosyleringsstedet til det ferdige EqIFN-gamma i posisjon 86-88 er understreket. De viktige sekvensene CCATC og TATAAAA for bindingen av RNA-polymerase er understreket, likeledes to signalsekvenser for polyadenyleringen av mRNA (AATAAA).

Figur 2: Sammenligning av aminosyresekvensene fra gamma-interferoner fra forskjellige arter. De aminosyrer som er nummerert med "S" stilt foran angir signalpeptidet. "Consensus"-sekvensen viser i store bokstaver de aminosyrer som forekommer identisk i

alle gammainterferoner, med små bokstaver de aminosyrer som forekommer i mer enn 75 % av gamma-interferonene.

Figur 3: Skjematiske angivelser av oligonukleotidene som anvendes for totalsyntesen av heste-gamma-interferon-genet. Lengden av de enkelte nukleotider og deres nummerering er angitt. Restriksjons-skjæringssteder som opptrer bare en enkelt gang innenfor det syntetiske genet, er nummererte.

Figur 4: Sammenligning av de kodende sekvensene for ferdig EqIFN-gamma av det naturlige gen (eq) og det syntetiske (syn), for ekspresjonen i E.coli av optimalisert gen. Base som er forskjellige er markert med en stjerne.

Figur 5: Tabell for de anvendte kodoner for ferdig EqIFN-gamma. På venstre kant er den første basen, i midten den andre basen og på høyre kant den tredje basen av kodonet angitt. Tabellen viser antallet av anvendte kodoner for den enkelte aminosyre i det naturlige gen, og i parentes for det syntetiske gen.

Figur 6: Konstruksjon av ekspresjonsplasmidet pRH100.

Figur 7: Konstruksjon og restriksjonskart for pGN20.

De følgende eksempler som ikke skal begrense oppfinnelsen beskriver oppfinnelsen i detalj.

Materialer

Utgangsmaterialene ble delvis kjøpt, delvis stammet de fra EMBL i Heidelberg. E.coli JM101 pUC9 og M13mp8 stammet fra Bethesda Research Laboratories, E.coli-stammene med supressor-faktoren sup F, for eksempel E.coli NM526, 538 og 539 og vektoren lambda-EMBL3 eller 3A stammer fra EMBL og kan

også fås fra firma Stehelin/Basel (Sveits).

1. Isolering av heste-DNA

Frosset vev, f.eks. hestelever ble oppmalt i flytende nitrogen til fint pulver og inkubert i 0,5M EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 % SDS, 0,1 mg/ml proteinase K (20 ml/g vev) i 3 timer ved 55°C. Den oppnådde viskøse løsning ble befridd for protein gjennom en fenolekstraksjon og 3-gangers ekstraksjon med fenol/kloroform/isoamylalkohol (25/24/1 volumdel), dialysert mot 50 mM tris-HCl pH 8,0, 10mM EDTA, 10mM NaCl og DNA'et utfeldd med 2 volumdeler etanol. Etter fullstendig tørking i vakuum ble DNA'et brakt i løsning i TE-buffer (10mM tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA) ved 4°C og sentrifugert med 1,273 g CsCl/ml løsning i 62 timer med 40.000 opm ved 20°C (Sorvall 50Ti-rotor). CsCl-gradienten ble dryppet ut, de DNA-holdige fraksjoner dialysert mot TE-buffer, og DNA'et deretter utfelt med 2 volumdeler etanol, vasket med 70 % etanol, tørket og igjen oppløst i TE-buffer (4°C).

Det ferdige DNA-preparat var fritt for RNA og lenger enn 50 kb (bestemt ved elektroforese på en 0,45 %ig agarosegel).

2. Partiell endonuklease-oppdeling og størrelsesfraksjonering av heste-DNA

To ganger 50 µg heste-DNA ble inkubert med 1,6 enheter Sau3A i 450 µl reaksjonsmedium (10 mM tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1mM ditiotreitotol) ved 37°C. Etter 15, 25 og 40 minutter ble 150 µl alikvoter tatt ut og blandet med 15mM EDTA. Ved 10 minutters oppvarming til 70°C ble reaksjonen stoppet. Etter tilsetning av 0,3M Na-acetat pH 6,0 ble DNA'et utfelt med 2,5 volumdeler etanol. Etter gjenopløsning i TE-buffer ble DNA'et skilt på en 0,45 %ig agarosegel i TBE-buffer (10,8 g/l tris, 5,5 g/l borsyre, 0,93 g/l Na₂EDTA) ved ca. 1 V/cm ved elektroforese natten over etter størrelse. Ved hjelp av størrelsesmarkører (Lambda-DNA) dobbeltspaltet med EcoRI og HindIII og spaltet med HindIII) ble gelstykket med DNA av en lengde på 10-23 kb skåret ut, DNA'et ble elektroeluert ved 300V fra en gel i en dialyse-slange i 3 timer (buffer 0,1 x

TBE), rensset på en Elutip-D-søyle (Schleicher og Schüll) ifølge anvendelsesforskriftene og deretter utfelt med etanol.

For å forhindre selv-ligeringen av heste-DNA-fragmenter, hvilket på den ene side kan føre til kunstige hybrider av heste-DNA-sekvenser, og på den annen side til for store og dermed ikke lenger lambda-fag forpakkbare DNA-stykker, ble de størrelsesfraksjonerte heste-DNA-stykker defosforylert.

Man inkuberte da DNA'et i 140 μ l reaksjonsmedium (50 mM tris-HCl pH 9,5, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM Zn-acetat, 1 mM spermidin) med 5 enheter bovin tarmfosfatase i 30 minutter ved 37°C, tilsatt ytterligere 5 enheter enzymer inkubert i 30 minutter. Etter tilsetning av EDTA til 25 mM sluttkonsentrasjon ble DNA'et en gang ekstrahert med fenol/kloroform/isoamylalkohol (25/24/1 vol), 2 ganger med kloroform/isoamylalkohol (24/1 vol) og 3 ganger med dietyleter, felt med etanol, tørket og oppløst i 0,1 x TE-buffer.

3. Oppbygning av hestegenom-DNA-bibliotek

De defosforylerte 10 - 23 kb heste-DNA-fragmenter ble klonet i en lambda-vektor, f.eks. lambda-EMBL3 eller -3A (Frischauf, A.M. et al., J. Mol. Biol., 170, 827-842 (1983)) med G-A-T-C kohesive ender oppnådd ved fjerning av det innvendige BamHI-fragmentet til fag-DNA.

Vektoren ble dyrket i en E.coli stamme med suppressorfaktor sup F, f.eks. E.coli NM526, 538 eller 539 (Frischauf, A.M. et al., J. Mol. Biol., 170, 827-842 (1983)), i LB-medium (Miller; Experiments in Molecular Genetics; Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, New York) med 5 mM MgSO₄, felt med polyetylglykol og rensset ved 2-gangers CsCl-tetthetsgradient-sentrifugering (0,71 g CsCl/ml løsning, 40 timer 45.000 opm, 20°C). Etter dialyse mot TE-buffer ble fag-DNA'et befridd for protein ved 2-gangers ekstraksjon med fenol/kloroform/isoamylalkohol (25/24/1 vol) og 2 gangers ekstraksjon med kloroform/isoamylalkohol (24/1 vol) og oppkonsentrert ved etanolfelling.

For å oppnå sluttfragmentet av EMBL3A ble 50 μ g fag-DNA oppdelt 2 timer ved 37°C i 450 μ l reaksjonsmedium (10 mM tris-

HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotreititol) fullstendig med BamHI, reaksjonen stoppet ved 70°C med 15 mM EDTA i 10 minutter og DNA'et utfelt med etanol.

For å unngå religieringen ble midtfragmentet etterkappet med EcoRI og det vekkfallende oligonukleotid fjernet ved hjelp av isopropanolfelling.

Det BamHI-oppdelte lambda-DNA ble da oppdelt fullstendig 2 timer ved 37°C i 450 µl 10 mM tris-HCl pH 7,5 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ med EcoRI og reaksjonen stoppet ved tilsetning av 15 mM EDTA og 10 minutters oppvarming ved 70°C. Etter tilsetning av Na-acetat til en sluttkonsentrasjon på 0,3M ble de tre store DNA-fragmenter felt med 0,6 volumdeler isopropanol i 15 minutter ved 0°C, vasket to ganger med 0,45M Na-acetat/0,6 volumdeler isopropanol og en gang med 0,3 M Na-acetat/2,5 volumdeler etanol og oppløst i 15 µl 0,1x TE-buffer. BamHI/EcoRI-linkeren forblir i løsning ved denne fremgangsmåte. EMBL3A fragmentene (8µg) slås sammen med ca. 5µg 10-23 kb heste-DNA og 10 enheter T4-DNA-ligase (NEN) og inkuberes natten over ved 14°C og en dag ved 4°C i 50 µl liggeringsmedium (66mM tris-HCl pH 7,2, 0,1 M NaCl, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA, 5mM ditiotreititol, 0,5mM ATP). Den ligerte DNA-blanding ble pakket ved hjelp av et in vitro lambda-forpakkingsystem (Scalenghe, F. et al., Chromosoma, 82, 205-216 (1981)) i fullstendige lambda-fag-partikler.

Bestanddelene i dette systemet, dvs. ultralyd-ekstrakt (SE), frosset-opptint-lysat (FTL), buffer M1 og A ble fremstilt ifølge (Scalenghe, F. et al., Chromosoma, 82, 205-216, (1983)). 10 µl alikvoter av den ligerte DNA-blanding ble inkubert i 2 minutter ved romtemperatur ved 25 µl SE, som likeledes var opptint som FTL 30 minutter fra is, blandet med 100 µl FTL og videre inkubert 60 minutter ved romtemperatur. Pakkings-blandingen ble fortynnet med 150 µl lambda-fortynningsmiddel (100 mM tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgSO₄, 1 mM EDTA) og lagret ved 4°C.

4. Kloning og sekvens-bestemmelse av genet for heste-gamma-interferon (EqIFN-gamma)

A. Isolering av et fullstendig EqIFN-gamma gen klon

Det equine DNA-bibliotek ble anvendt for infeksjon av *E. coli* stammen NM528 (supF). En bakteriekultur som hadde vokst natten over i LB-næringsløsning (10 g/l trypton, 5 g/l gjærekstrakt) 10 g/l NaCl, pH 7,4) med 0,2 % maltose ble i 10 mM MgSO₄ innstilt på en optisk tetthet (600 nm) på 2,0. 0,5 ml porsjoner av denne suspensjonen ble infisert med 50.000 pfu (plaque-dannende enhet) lambda-fager fra DNA-biblioteket og fordelt med et LB-mykagar-skikt på LB-agar-plater med 10 mM MgSO₄ (13,5 cm diameter). Tilsammen ble 1,5x10⁶ rekombinante lambda-fager utprøvet. Etter dyrking natten over ved 37°C ble det fra fagene på hver plate fremstilt 2 replikater på nitrocellulose (Benton og Davis, Science 196:180-182, 1977). Etter denaturering av fag-DNA (1 min i 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl) nøytralisering (2 ganger 3 minutter i 0,5 M tris-HCl pH 7,5, 1,5 M NaCl) og spyling (1 min i 2xSSC, 1xSSC, 0,15 M NaCl, 15 mM Na-citrat) ble filtrene tørket i luft og DNA'et fiksert ved 2 timers oppvarming ved 80°C. Filtrene ble vasket natten over ved 65°C i en løsning av 1,5 M NaCl, 10 mM tris-HCl pH 8,0, 0,1 % SDS og forhybridisert 4 til 6 timer ved 65°C (hybridiseringsløsning: 0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,1 % Ficoll, 0,1 % polyvinylpyrrolidon, 0,1 % kvegserumalbumin, 0,1 % SDS, 20 mg/ml lydbehandlet og denaturert laksesperm-DNA).

Hybridiseringen fant sted i en frisk løsning med 10⁶ cpm pr. filter av en etter vanlig metoder radioaktivt merket HuIFN-gamma "probe" i 20 timer ved 65°C. Filtrene ble vasket under ikke stringente betingelser i 3xSSC, 0,1 % SDS ved 65°C, tørket og autoradiografert. Etter tre gjennomløp med plaque-rensing kunne 5 lambda-kloner identifiseres som ga positive hybridiserings-signaler.

Fra disse isolerte rekombinante fager ble DNA'ene rensert etter vanlige metoder (Maniatis et al., *ibid.*). Fag-DNA'ene ble karakterisert ved spaltning med forskjellige restriksjons-enzymmer og etterfølgende Southern-analyse (Southern, *J. Mol. Biol.* 98: 503-517, 1975) gjennom hybridisering med HuIFN-gamma

"probe". Et singulært hybridiserende 4,6 kb langt BamHI-fragment av klonet lambda Eq-gamma2 ble isolert og klonet i BamHI-skjæringsstedet til plasmidet pUC9 (Vieira og Messing, Gene 19: 259-268, 1982). Etter transformasjonen av E.coli JM101 ble plasmid-DNA fremstilt fra oppnådde kolonier i en mini-fremstillingsmetode (Birnboim og Doly, Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523, 1979) og karakterisert ved spaltning med restriksjons-enzymmer. Et plasmid med det ønskede BamHI-innskudd ble kalt pAH111. Kantene til BamHI-innskuddet av plasmid pAH111 ble etter innføring i M13mp8 hhv. M13mp9 vektorene (Vieira og Messing, Gene 19, 259-268, 1982) sekvensbestemt etter didesoksy-metoden (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977). En sekvenssammenligning med det humane gamma-interferon-genet (Gray og Goeddel, Nature 298: 859-863, 1982) viste en høy homologi med de ikke-kodende 5'- og 3'-regioner. Derav sluttet man at det fullstendige EqIFN-gamma-genet ble isolert.

B. Sekvensbestemmelse av heste-gamma-interferongenet fra klon

lambda Eq-gamma2.

Det 4,6 kb lange BamHI-innskuddet fra plasmid pAH111 ble sekvensbestemt fullstendig etter didesoksy-metoden. Total-sekvensen av BamHI-fragmentet ble bestemt ved en kombinasjon av delsekvenser av M13-subkloner, som man fikk ved rettet kloning av restriksjonsfragmenter (EcoRI, HindIII, PstI, PstI-BglII, HindIII-BamHI) i tilsvarende oppkappede M13mp8 eller M13mp9 vektorer. Videre delsekvenser fikk man idet det 2,0 kb lange BamHI-BglII fragment, hhv. det 2,0 kb lange PstI framgent ble klonet etter "Shotgun-metoden" i M13mp8 vektoren. De to DNA-fragmenter ble oppdelt ved ultralyd i mindre stykker, endene gjort butte ved inkubering med E.coli DNA-polymerase I (Klenow-fragment) i nærvær av 0,1 mM av alle fire desoksynukleotid-trifosfater (reaksjonsbuffer: 50 mg/ml kvegserumalbumin: 1 time ved 25°C). Etter størrelsesfraksjonering i en agarosegel ble DNA-fragmentene med en lengde på ca. 0,4 - 1,0 kb isolert og ligert i SmaI skjærings-

stedet av M13mp8-vektoren. De oppnådde delsekvenser ble forenet ved hjelp av et computer-program til den 4664 bp lange totalsekvens som er vist på fig. 1.

Ved computerhjulpert analyse av de åpne leserammer og sammenligning med andre typer av gamma-interferongener (Gray og Goeddel, Nature 298: 859-863; Gray og Goeddel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5842-5846, 1983; Dijkema et al., EMBO J. 4: 761-767, 1985; Cerretti et al., J. Immunology 136: 4561-4564) ble det proteinkodende område av det equine gamma-interferongenet målt. Det proteinkodende område er avbrutt med tre introner, hvorunder i det første eksonet kodets de 20 aminosyre lange, hydrofobe signalpeptidet og 18 aminosyrer av det ferdige EqIFN-gamma polypeptidet (baser 366-479). Det andre ekson koder for aminosyrene 19-41 (baser 1639-1707), det tredje eksonet koder for aminosyrene 42-102 (baser 1803-1985), det fjerde eksonet koder for karboksy-enden med aminosyrene 103-146 (base 3307-3441). På posisjonene 4010 og 4020 befinner det seg to signalsekvenser (AATAAA) for polyadenyleringen av mRNA. På posisjonene 86-88 av det fullstendige EqIFN-gamma polypeptidet befinner det seg det eneste potensielle N-glykosyleringsstedet (ASN-Ser-Ser) som faller sammen med det andre N-glykosyleringsstedet til storfe-gamma-interferon (Asn-Gly-Ser) (Fig. 2). Det fullstendige EqIFN-gamma polypeptidet inneholder overraskende bare en eneste cysteinrest på posisjon 3, hvorunder analogt med de naturlige humane og musedyrs gamma-interferoner de første tre aminosyrene terminale aminosyrer (i dette tilfellet Tyr-Tyr-Cys) sansynligvis avspaltes proteolytisk i organismen.

5. Fremstilling av et syntetisk gen for fullstendig EqIFN-gamma

For å eksprimere rekombinant EqIFN-gamma i sin fullstendige form i *Escherichia coli* konstruerte man et syntetisk gen fra oligonukleotider. Det koder for den samme aminosyresekvensen som det naturlige EqIFN-gamma genet, men inneholder utelukkende slike kodoner for de enkelte aminosyrer som anvendes i høyt eksprimerte, celleegne gener for *E. coli* (Gouy

og Gautier, Nucl. Acids. Res. 10: 7055-7074, 1982). I tillegg ble flere singulære restriksjonsenzym-skjæringssteder innbygget, som muliggjør en enkel manipulasjon av genet for forandring av de enkelte avsnitt. Det syntetiske genet for EqIFN-gamma ble konstruert i to varianter av tilsammen forskjellige oligonukleotider. Den første varianten koder for fullstendig EqIFN-gamma med 146 aminosyrer pluss startmetionin, og den andre formen for et polypeptid som er forkortet med tre aminosyrer (Tyr-Tyr-Cys) på amino-enden pluss startmetionin, som sansynligvis burde forekomme i den naturlige organisme.

Strukturen til det syntetiske EqIFN-gamma genet er vist på fig. 3. Oligonukleotiden som anvendtes for fremstillingen ble syntetisert ved hjelp av en Applied Biosystems Model 381A DNA-syntetisator, renses ved elektroforese i denaturerende 12 %ige polyakrylamidgeler (7 M urea) og avsaltet ved hjelp av utelukkelse-kromatografi gjennom Sephadex G-25 (Pharmacia).

Sammenbygning av oligonukleotidene til syntetisk EqIFN-gamma gen

Sammenbygningen av det syntetiske EqIFN-gamma genet fant sted i to avsnitt. Den første delen av genet ble fremstilt ved hjelp av de åtte oligonukleotider EG-1 til EG-8 frem til SalI-skjæringsstedet, den andre halvdel av genet fra de seks oligo-nukleotider EG-9 til EG-14 fra SalI-skjæringsstedet til BamHI-skjæringsstedet. For dem med tre aminosyrer forkortede form av EqIFN-gamma på aminoenden anvendtes i stedet for oligo-nukleotidene EG-1 og EG-2 oligonukleotidene EG-15 og EG-16.

Oligonukleotidene som er komplementære til hverandre ble fosforylert parvis på 5'-enden. 100 pMol av hver av de to oligonukleotider (f.eks. EG-3 og EG-4, hhv. EG-5 og EG-6 osv.) ble inkubert i 9 μ l kinase-buffer (70 mM tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM ditiotretitol), 2 μ Ci [γ -³²P]ATP (Amersham) med 10 enheter T4-polynukleotidkinase (New England Biolabs) i 10 minutter ved 37°C, 1 μ l av en 10 mM ATP-løsning tilsatt og inkubert ytterligere 50 minutter ved 37°C. Reaksjonen ble

stoppet ved 10 minutters oppvarming til 95°C. For å forhindre senere sammenkobling av DNA-endene ble oligonukleotidene EG-1, EG-15, EG-9 og EG-14 ikke fosforylert. De ble første etter inaktivering av polynukleotidkinasen blandet med det enkelte komplementære oligonukleotid, oppvarmet 5 minutter ved 95°C og avkjølt til romtemperatur.

Blandingene av oligonukleotidene EG-1+2 (hhv. i en andre sats EG-15+16), EG-3+4, EG-5+6 og EG-7+8 ble forenet, blandet med 1 µl 5 M NaCl, oppvarmet 5 minutter til 70°C og avkjølt til romtemperatur. Til denne løsningen satte man 5 µl 10 mM ATP, 2 µl ditiotreititol, 1,5 µl 10x ligeringsbuffer (0,66 M tris-HCl pH 7,2, 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 50 mM ditiotreititol) og 80 enheter T4 DNA-ligase (New England Biolabs) og inkubert i 48 timer ved 4°C. Forløpet av ligase-reaksjonen ble forfulgt ved gelelektroforetisk separasjon av DNA-fragmentene av en liten reaksjonsandel i en 5 %ig, ikke-denaturerende polyakryl-amidgel og etterfølgende autoradiografi. På samme måte ble de seks oligonukleotidene EG-9 til EG-14 knyttet sammen med hverandre. Reaksjonen ble stoppet ved fenol/kloroform-ekstraksjon, og DNA'et gjenvunnet ved etanolfelling.

6. Konstruksjon av ekspresjonsplasmidet pRH 100

Alle enzymreaksjoner ble utført under de betingelser som er angitt av produsentene.

7 µg plasmid pER103 (Eva Dworkin-Rastl et al., Gene 21 (1983) 237248, EP-A-0.115.613) ble lineærisert i 50 µl reaksjons-medium med restriksjonsendonukleasen HindIII. Etter en en-times inkubasjon ved 37°C ble 50 µl 2x CIP-buffer tilsatt (2x CIP-buffer = 20 mM tris, pH=9,2, 0,2 mM EDTA). Ved tilsetning av 2 enheter alkalisk fosfatase fra kalvetarm (CIP) ble de 5'-terminale fosfatrester fjernet og man inkuberte i 30 minutter ved 45°C. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 4 µl 0,5 mM EDTA-løsning samt tilsetning av 10 µl 1M tris, pH=8,0 løsning. Proteinene ble fjernet ved 2 gangers fenol- og 1 gangs fenol-kloroform-ekstraksjon. DNA'et ble utfelt fra den vandige fasen ved tilsetning av 0,1 vol 3M

natriumacetatløsning pH=5,5 og 250 μ l etanol, DNA-fellingen vasket etter sentrifugering 1 gang med 70 %ig etanolløsning. DNA'et ble tørket, og klumpen så oppløst i 20 μ l TE-buffer (10 mM tris pH=8,0, 1 mM EDTA).

1 μ g av hvert av de fremstilte oligonukleotider d(AGCTTAAAGATGAGCT) og d(CATCTTTA) ble fosforylert i 10 μ l reaksjonsløsning under tilsetning av 10 enheter T4-PNK (polynukleotidkinase) samt 1 mM rATP. Reaksjonen fant sted ved 37°C og varte i 45 minutter. Reaksjonen ble avbrutt ved 10 minutters oppvarming til 70°C.

5 μ l av hver plasmidløsning og de fosforylerte oligonukleotider ble blandet og oppvarmet 5 minutter ved 70°C. Deretter ble løsningen avkjølt til 0°C, og 2 μ l 10x ligasebuffer (500 mM tris pH=7,5), 100 mM MgCl₂, 200 mM DTT (dithio-treitol), 1 mM rATP, 500 μ g/ml BSA (storfeserumalbumin) samt 2 μ l vann, og 10 enheter T4-DNA-ligase ble tilsatt. Reaksjonen varte i 40 timer og ble gjennomført ved 4°C. Den ble stoppet ved 10 minutters oppvarming til 70°C.

2 μ l av denne ligasereaksjonen ble spaltet i tilsammen 30 μ l løsning med 10 enheter av restriksjons-endonukleasen SacI (New England Biolabs) i 3 timer ved 37°C. Reaksjonen ble stoppet etter 10 minutters oppvarming til 70°C. 5 μ l av denne reaksjonsblandingen ble ligert i tilsammen 30 μ l ved tilsetning av 10 enheter T4-PNK ved 14°C i 16 timer.

200 μ l kompetente E.coli HB101 ble blandet med 10 μ l av denne ligasereaksjonen. Bakteriene ble holdt 45 minutter på is og deretter oppvarmet i 2 minutter til 42°C for å muliggjøre DNA-opptaket. Så ble bakteriesuspensjonen igjen inkubert 10 minutter ved 0°C. Deretter ble de transformerte bakteriene strøket ut på en LB-agar som inneholdt 50 μ g/ml ampicillin.

Fra de oppståtte bakteriekoloniene ble 12 utplukket vilkårlig og plasmidene isolert fra dem i mikromålestokk (Birnboim og Doly, Nucl. Acids Res. 7 (1979) 1513-1523). De resulterende DNA'er ble kappet med restriksjonsendonukleasen SacI, og DNA separert på en agarosegel (1 %, 1x TBE-buffer). DNA'ets vandring som et lineært molekyl med størrelse fra ca.

4.400 bp bekreftet innføringen av et SacI-gjenkjennelsessted i plasmidet. Et av disse plasmidene ble utplukket vilkårlig. Med DNA'et fra det tilhørende minipreparat ble E.coli HB101 igjen transformert. Fra de resulterende transformerte bakterier ble en koloni valgt ut og dyrket i stor målestokk. Plasmidet som ble isolert fra dette ble kappet med restriksjonsendonukleasen EcoRI og BamHI, DNA'et separert på en 1 % agarosegel, og det mindre fragment ble isolert fra gelen ved elektroeluering. Dette ca. 460 bp lange EcoRI-BamHI DNA-fragment ble sekvens-bestemt ifølge Sanger (F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1977) 5463-5467). Det således analyserte plasmidet ble kalt pRH100.

7. Innføring av det syntetiske EgIFN-gamma gen i ekspresjonsplasmidet pRH100

10 µg plasmid pRH100 kappes i 100 µl reaksjonsbuffer med SacI fullstendig og enzymet inaktiveres ved 10 minutters oppvarming til 70°C. De overhengende DNA-endene gjøres butte ved behandling med Klenow-fragment (Amersham) i nærvær av 10 µM av alle fire desoksynukleotid-trifosfater (30 minutter, 25°C). Reaksjonen stoppes med fenol/kloroform-ekstraksjon og DNA'et konsentreres ved etanolfelling. Gjennom denne behandlingen dannes i tilslutning til tryptofanpromotoren en butt DNA-ende som ender med translasjonsstartkodonet "ATG". Det lineæriserte plasmid-DNA etterkappes med BamHI og vektorandelen isoleres etter elektroforeseseparasjon på en agarosegel.

50 ng av den som beskrevet forberedte pRH100 plasmidvektoren blandes med 20 pMol av de ligerte oligonukleotider EG-1 til EG-8 og EG9 til EG-14 og inkuberes i 10 µl ligeringsbuffer (66 mM tris-HCl pH 7,2, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM ditiotretitol, 1 mM ATP) med en enhet T4 DNA-ligase (Boehringer Mannheim) 24 timer ved 14°C. E.coli JM101 som er gjort kompetente ved behandling av kalsiumklorid transformeres med denne ligeringsblandingen og inkuberes natten over ved 37°C. Fra de erholdte transformanter isoleres ved minipreparerings-metoden plasmid-DNA og strukturen

bestemmes ved restriksjons-analyse og sekvensbestemmelse av HindIII-BamHI-inskuddet. Et plasmid med den ønskede struktur for ekspresjon av fullstendig EqIFN-gamma kalles pEqG-YYCl. På fullstendig analog måte kloner oligonukleotidene EG-15,16 EG-3 til EG-8 og EG-9 til EG-14 i pRH100 vektoren for å oppnå EqIFN-gamma som er forkortet med tre aminosyrer. Et plasmid med den ønskede struktur kalles pEqG-QAAl.

8. Ekspresjon av interferonaktiviteten gjennom E.coli JM101 som inneholder plasmidet pEq-YYCl eller pEqG-QAAl.

100 ml bakteriekultur inkuberes ved 37°C under kraftig rysting i følgende tryptofanfrie medium (angivelse pr. liter medium): 10 g (NH₄)₂PO₄, 3,5 g KH₂PO₄ pH 7,3 med NaOH, 0,5 g NaCl, 21 g kasaminsyrer (surt hydrolysert), 11 g glukose, 1 mM MgSO₄, 0,1 mM CaCl₂, 1 mg tiamin-HCl, 20 mg L-cystein, 20 mg 3-β-indolakrylsyre (IAA, induktor for tryptofan-operon), 50 til 100 mg ampicillin. Så sammenklumpes bakteriene ved sentrifugering i 5 minutter ved 4000 opm, oppslemmes med 1/10 av dyrkningsvolumet iskald 50 mM tris-HCl pH 8,0, 30 mM NaCl og brytes opp 2 x 30 sekunder iskjøling ved hjelp av ultralyd-probe (20 kHz, 100 Watt). Celleavfallet fjernes 10 minutter ved 10.000 opm (4°C) og supernatanten undersøkes etter sterilfiltrering med hensyn til interferonaktivitet i en måling som angir den cytopatiske virkning (CPA) for vesikulær stomatit-virus (VSV) eller encefalomyokardit-virus (EMCV).

Forsøkssystem: NBL-6 celler (ATCC CCL 57, hestehud-epidermis-celler/VSV
A549 (ATCC CCL 185, human lungekarsinom-cellelinje)/EMCV

Styrken på A 549-celler normeres med human-interferon-standard til internasjonale enheter.

9. Påvisning av eksprimerte heste-interferoner ved markering av proteinene i maksiceller

Plasmidkodete proteiner kan markeres selektivt in vivo ved anvendelse av maksicelle-teknikk. E.coli CSR603

transformeres etter vanlige metoder med ekspresjonsplasmidene og seleksjoneres med hensyn til transformerte bakterier på ampicillin-holdige agarplater. Prepareringen av maksicellene og markeringen av proteinene skjer etter en forskrift fra A. Sancar (a.a.O). Cellene dyrkes i 15 ml medium (se eksempel 8) uten indolakrylsyre ved 37°C opp til en $OD_{600nm}=0,5$, og 10 ml av denne kulturen bestråles i en petriskål i 5 sek. fra 50 cm avstand med en UV-germicid-lampe (15 Watt) under bevegelse og videre-inkuberes en time ved 37°C. Kulturene blandes med 100 µg/ml D-cykloserin, inkuberes 14 timer ved 37°C, og bakteriene høstes så ved sentrifugering. Cellene vaskes to ganger med 5 ml Hershey-salt-løsning, oppslemmes i 5 ml Hershey medium med 20 µg/ml indolakrylsyre og inkuberes 2 timer ved 37°C. Hver kultur tilsettes 5 µCi/ml ^{35}S -metionin (1000 Ci/mMol) og ristes en time ved 37°C. Cellene høstes i SDS- og 2-merkapttoetanolholdig elektroforese-probebuffer, lyses og proteinene separeres på en 15 %ig polyakrylamidgel.

Hershey-saltløsning (pr. liter)	Hershey medium (pr. 100 ml Hershey-saltløsning)	
5,4 g NaCl	2 ml	20 % glukose
3,0 g KCl	0,5 ml	2 % treonin
1,1 g NH ₄ Cl	1,0 ml	1 % leucin
15 mg CaCl ₂ .2H ₂ O	1,0 ml	2 % prolin
0,2 g MgCl ₂ .6H ₂ O	1,0 ml	2 % arginin
0,2 mg FeCl ₃ .6H ₂ O	0,1 ml	0,1 % tiamin
87 mg KH ₂ PO ₄		
12,1 g tris-HCl pH 7,4		

Et autoradiogram av den tørkede gelen vises etter 2 dagers eksponering på DuPont Cronex røntgen-film under anvendelse av et Kodak Lanex-regulær forsterkerfolie ved -80°C. Som molekyl-vekts-standard anvendes en ^{14}C -metylert proteinblanding (Amersham). Plasmidet pER103 tjener som kontroll, hvilket bare inneholder promotoren uten interferongen og plasmidet pER21/1, som inneholder to kopier av det

humane IFN- γ genen.

10. Påvisning av sekvenser som hybridiserer med EqIFN-gamma i genomisk heste-DNA

For påvisning av totalantallet av sekvenser i hestegenomet som har høy homologi med interferongen EqIFN-gamma går man frem som følger. 30 μ g høymolekylært heste-DNA (eks. 1) spaltes med 100 enheter av det tilsvarende restriksjonsenzym i 300 μ l reaksjonsvolum fullstendig og 10 μ g av hver av disse kappede DNA pr. spor separeres på en 0,8 % agarosegel etter størrelsen.

Etter Southern-overføring til nitrocellulosefilter, denaturering og fiksering av DNA'et hybridiserer man hvert filter med ca. 6×10^6 cpm radioaktivt merket "probe" (17 timer ved 65°C, 5x SSC, 5x Denhardt-løsning, 0,1 % SDS, 20 μ g/ml denaturert laksesperm-DNA). Som "probe" for EqIFN-gamma anvendes et fragment fra plasmidet pEqG-YYC1 som inneholder sekvensen som koder for hele det ferdige interferon. Filteret vaskes så under stringente betingelser: 4 ganger 45 minutter ved 65°C med 0,3x SSC (45 mM NaCl, 4,5 mM Na₃ citrat), 0,1 % SDS. Autoradiografien finner sted på DuPont Cronex røntgenfilm under anvendelse av Kodak Lanex-regulær forsterkerfolie 7 dager ved -80°C.

11. Ekspresjon av equint interferon-gamma (QAA) i E.coli HB101/pEqG-QAA2 og HB101/pEqG-QAA3.

For å få en forbedret ekspresjon ble

- a) forbedrede ekspresjonsvektorer og
- b) et forbedret ribosomalt bindingsted anvendt.

De forbedrede ekspresjonsvektorer bygger på trp-promotoren fra *Serratia marcescens* (Sma), som i -35 området er tilpasset til konsensus -35 området ved et baseutbytte (pRH281), hhv. på en hybrid-trp promotor, som har det første A/T-rike området til *Escherichia coli* (Eco) hhv. det andre av A/T-rike området pluss promotor av Sma (pRH282, S. Itoh, gene 44 (1966), 29-36). Som ribosomalt bindingssted anvendes det for *E.coli* enterotoksin II.

a) pRH281/5

Følgende oligonukleotider ble fremstilt ved hjelp av en Applied Biosystems DNA syntetisator 381A:

Trp-1: 5'-AATTGACGCTG-3'
 Trp-3: 5'-ATCGCTAAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACATTGCCTTCGCGAACCA
 GTTAACTAGTACACA-3'
 Trp-5: 5'-AGTTCACGGCTCGAGACGGTAAGGAGGTTTAATATGAGCTCGAATTCAT-
 3'
 Trp-2: 5'-TTAGCGATCAGCGTC-3'
 Trp-4: 5'-CGTGAACCTGTGTACTAGTTAACTGGTTCGCGAAGGCAATGTCAACCCT
 CTTTTTGCACAATGTT-3'
 Trp-6: 5'-CGATGAATTCGAGCTCATATTAAACCTCCTTACCGTCTCGAGC-3'

100 pMol av hvert oligonukleotid Trp-2 til Trp-5 ble fosforylert separat i 10 μ l. Trp-1 og -2, Trp-3 og -4 samt Trp-5 og -6 ble hybridisert ved oppkoking og langsom avkjøling. Oligonukleotid-par-løsninger ble slått sammen og ligert ved tilsetning av T4-DNA-ligase. 3 μ g pAT153 ble dobbeltkappet med EcoRI og ClaI. Etter rensing av det store fragment ble dette blandet med ca. 20 pMol oligonukleotider og ligert. DNA'et ble så transformert i E.coli HB101 og plasmidene fra noen resulterende kolonier isolert. Pst-HindIII-fragmentet som inneholdt promotoren, ble sekvensbestemt. Etter bekreftelse på den ønskede sekvens ble et plasmid valgt ut og kalt pRH281/5.

Sekvensen til promotordelen lyder:

-35

5'-GAATTGACGCTGATCGCTAAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACATTGC
 3'-CTTAACTGCGACTAGCGATTTTGTAAACACGTTTTTCTCCAACTGTAACG

XhoI

-10 !Transkripsjonsstart

CTTCGCGAACCGTAACTAGTACACAAGTTCACGGCTCGAGACGGTAAG
 GAAGCGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGAGCTCTGCCATTC

RBS SstI EcoRI ClaI

GAGGTTTAATATGAGCTCGAATTCATCGAT-3'
 CTCCAAATTATACTCGAGCTTAAGTAGCTA-5'

Fordelene ved den nye ekspresjonsvektoren er:

- 1) optimal -35 område i trp-Sma promotoren
- 2) singulært XhoI-setet foran det ribosomale bindings-setet (RBS) tillater utbygging av RBS mot et annet.
- 3) ekspresjonsplasmidene inneholder en translasjonsstart ATG i avstand på 5 nukleotider etter RBS
- 4) G'et i dette ATG er den første basen til SstI-gjenkjennelses-sekvensen (GAGCTC). Ved kapp med SstI og etterfølgende dannelse av en rett ende står en ekspresjonsvektor med ett translasjonsstart-ATG til rådighet, på hvilket et fremmed gen som begynner med leserammens første base kan ligeres til.
- 5) forbindelsen RBS-ATG inneholder ikke noe G eller C
- 6) gjennom valget av oligonukleotid-sekvensen på 5'-enden ble det opprinnelige EcoRI skjæringsstedet ødelagt. Derved kan det på 3'-enden av promotoren frembringes et multiklonings-sted bestående av SstI, EcoRI, ClaI og HindIII (allerede i pAT153 andelen).

b) pRH282/5

På samme måte ble ekspresjonsvektoren pRH282/5 sammenbygget. Oligonukleotidene Trp-1 og Trp-2 ble erstattet med oligonukleotidene Trp7 og Trp-8:

Trp-7: 5'-AATTGCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTTGGCGCGACATCATCATGCT-3'

Trp-8: 5'-TTAGCGATCAGCATGATGATGTCGGCGCAAAAACATTATCCAGAACGGGC-3'

Sekvensen til promotordelen i pRH282/5 lyder:

5'-GAATTGCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTTGGCGCGACATCATCATGCTGAT
3'-CTTAACGGGCAAGACCTATTACAAAAACGGCGCTGTAGTAGTACGACTA

-35

CGCTAAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACATTGCCTTCGCGAACCAGT
GCGATTTTGTAAACACGTTTTTCTCCCAACTGTAACGGAAGCGCTTGGTCA

XhoI

-10 | Transkriptionsstart RBS
TAACTAGTACACAAGTTCACGGCTCGAGACGGTAAGGAGGTTTAATATGA
ATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGAGCTCTGCCATTCCCTCCAAATTATACT

SstI EcoRI ClaI
GCTCGAATTCATCGAT-3'
CGAGCTTAAGTAGCTA-5'

c) pGN1

1 μ g pUC18 ble dobbeltkappet med BamHI og SalI. Fra 10 μ g EqG-QAAl ble likeledes med BamHI-SalI dobbeltkapping den andre halvdel av det syntetiske heste-gamma-interferon-genet isolert og defosforylert. Ca. 20 ng vektor ble ligert med 100 ng innskudd og DNA'et transformert i E.coli JM101. Plasmidet fra en koloni ble prøvet ved hjelp av restriksjonsenzym-spaltning og kalt pGN1.

d) pGN3

Den første halvdel av det syntetiske genet ble sammen med det ribosomale bindingsstedet satt sammen av oligonukleotidene:

EqG-1: 5'-AGCTTCCCTCGAGAGGTTGAGGIGATTTATGCAGGCTGCTTTCTTTAAAG
AAATCGAAAACCTGAAAGAATACTTCAACGCTCGTAACCCAGACGTTGGT-3'

EqG-2: 5'-GACGGTGGTCCGCTGTTCCCTGGACATCCTGAAAACTGGAAAGAAGACTC
TGACAAAAAGATCATCCAGTCTCAG-3'

EqG-3: 5'-ATCGTTTCTTTCTACTTCAAACGTGTTGAAAACCTGAAAGACAACCAGGT
TATCCAGAAATCGATGGACACTATCAAAGAAGATCTGTTCTTAAATTCT
TAAACTCGTCGACTCCG-3'

EqG-4: 5'-AATTCGGAGTCGACGAGTTGAAGAATTTAACGAACAGATCTTCTTTGATA
GTGTCCATCGATTTCTGGATAACCTGGTTGTCTTTCAGGTTTTCGAACAG
TTTGAAGTAGAAAGAAACGATCTGAGACTG-3'

EqG-5: 5'-GATGATCTTTTTGTTCAGAGTCTTCTTTCAGTTTTTCCAGGATGTCCAGGA
ACAGCGGACCACCGTCACCAACGTC-3'

EqG-6: 5'-TGGGTTACGAGCGTTGAAGTATTCTTTCAGGTTTTCGATTTCTTTAAAGA
AAGCAGCCTGCATAAATCACCTCAACCTCTCGAGGGA-3'

50 pMol av hvert oligonukleotid ble fosforylert som følger:

EqG-2 sammen med EqG-5 i 7 μ l, EqG-3 og EqG-8 alene i 8 μ l hver. Kinasereaksjonen ble stoppet ved oppvarming til 100°C. Til EqG-3 satte man 50 pMol EqG-4 (1 μ l) og til EqG-8 50 pMol

EqG-1 (1 μ l). Løsningene ble igjen oppvarmet til 100°C og langsomt avkjølt. Oligonukleotid-parløsningene ble slått sammen og ligert med T4-DNA-ligase i tilsammen 30 μ l, 2 μ g pUC18 ble dobbeltkappet med EcoRI og HindIII, vektordelen gelrenset og oppløst i 50 μ l vann. 40 ng vektor og ca. 2 pMol ligerte oligonukleotider ble ligert i 10 μ l og DNA'et deretter transformert i E.coli JM101.

EcoRI-HindIII innskuddet til noen resulterende plasmider ble omklonet i M13mp9 og sekvensen overprøvet. Et plasmid med den ventede sekvens ble valgt ut og kalt pGN-3.

e) pGN20

Ca. 3 μ g pGN1 hhv. pGN3 ble dobbeltkappet med HindIII og SallI. Innskuddet av pGN3 og vektoren/2. halvdel av Eq-gamma-interferon-genet fra pGN1 ble gelrenset. 0,2 μ g pGN3 ble ligert med ca. 0,05 μ g pGN3-innskudd, og DNA'et transformert i E.coli JM101. Plasmidet av et resulterende klon ble etter overprøving av restriksjonsmønsteret valgt ut og kalt pGN20.

f) pEqG-QAA2 hh. pEqG-QAA3

Fra ca. 10 μ g pGN20 ble XhoI-EcoRI innskuddet som inneholdt det syntetiske heste-gamma-interferon-gen sammen med det ribosomale bindingsstedet for E.coli enterotoksin II (C.H. Lee et al., Infect. Immun. 42 (1983), 264-268; S.L. Moseley et al., Infect. Immun. 39 (1983), 1167-1174) isolert. pRH281/5 hhv. pRH282/5 ble dobbeltkappet med XhoI og EcoRI. 20 ng vektor ble ligert med 20 ng innskudd, og DNA'et transformert i E.coli HB101. Noen kolonier ble valgt ut, plasmidene isolert og overprøvet med restriksjonsanalyse. Hver gang et plasmid ble valgt ut og kalt pEqG-QAA2 (vektor: pRH281/5) hhv. pEqG-QAA3 (vektor: pRH282/5).

g) Lysatprøve på interferon-gamma-aktivitet.

En natten over kultur av E.coli HB101/pEqG-QAA2 hhv. HB101/pEqG-QAA3 ble fortynt 1:100 med LB/Amp (LB:10 g/l trypton, 5 g/l gjærekstrakt, 5g/l NaCl, 50 mg/l ampicillin) og inkubert videre ved 37°C. Når man nådde en optisk densitet

(600 nm) på 0,3, ble 50 mg/l indolakrylsyre tilsatt og kulturen inkubert 2 timer til ved 37°C. Bakteriene ble sentrifugert fra og brutt opp ved hjelp av ultralyd. Den steril-filtrerte supernatanten ble prøvet på NBL-6-celler (ATCC CCL 57) med hensyn til gamma-interferon-aktivitet, hvorunder vesicular stomatitt virus (VSV) til slutt ble anvendt som virus. Lysatene av begge transformerte bakteriekulturer (E.coli HB101/pEqG-QAA2 hhv. HB101/pEqG-QAA3) viser ca. 0,1 til 1 millioner enheter/ml interferonaktivitet. For kontroll ble et identisk fremstilt E.coli HB101/pRH281 lysat prøvet. Dette kontroll-lysatet viste mindre enn ca. 100 enheter/ml.

P a t e n t k r a v

1. Ekspresjonsvektor som koder for, og kan uttrykke et polypeptid med de biologiske og immunologiske egenskapene til EqIFN- γ ,

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter et DNA-molekyl som koder for et polypeptid med de biologiske og immunologiske egenskapene til EqIFN- γ med en sekvens som inneholder tryptofan-promotoren, valgt fra gruppen

R ¹	TACTGCCAGG	CTGCTTTCCT	TAAAGAAATC	GAAAACCTGA	AAGAATACTT	50
	CAACGCTCGT	AACCCAGACG	TTGGTGACGG	TGGTCCGCTG	TTCTGGACA	100
	TCCTGAAAAA	CTGGAAAGAA	GACTCTGACA	AAAAGATCAT	CCAGTCTCAG	150
	ATCGTTTCTT	TCTACTTCAA	ACTGTTTCGAA	AACCTGAAAG	ACAACCAGGT	200
	TATCCAGAAA	TCGATGGACA	CTATCAAAGA	AGATCTGTTC	GTTAAATTCT	250
	TCAACTCGTC	GACTTCTAAA	CTGGAAGACT	TCCAGAAACT	GATCCAGATC	300
	CCAGTTAACG	ACCTGAAAGT	TCAGCGTAAG	GCTATCTCTG	AACTGATCAA	350
	AGTTATGAAC	GACCTGTCTC	CAAAAGCTAA	CCTGCGTAAA	CGTAAACGTT	400
	CTCAGAACCC	ATTCCGTGGT	CGTCGTGCTC	TTCAGTAA,		

hvor R¹ betyr

ATGAATTATA CAAGTTTTAT CTGGCTTTT CAGCTGTGTG CGATTTTGGG 50
 TTCTTCTACC TAT,
 ATGTAT,

eller

TAT

og

```

R2GCTGCTTTCT TTAAAGAAAT CGAAAACCTG AAAGAATACT TCAACGCTCG 50
TAACCCAGAC GTTGGTGACG GTGGTCCGCT GTTCCTGGAC ATCCTGAAAA 100
ACTGGAAAGA AGACTCTGAC AAAAAGATCA TCCAGTCTCA GATCGTTTCT 150
TTCTACTTCA AACTGTTTGA AAACCTGAAA GACAACCAGG TTATCCAGAA 200
ATCGATGGAC ACTATCAAAG AAGATCTGTT CGTTAAATTC TTCAACTCGT 250
CGACTTCTAA ACTGGAAGAC TTCCAGAAAC TGATCCAGAT CCCAGTTAAC 300
GACCTGAAAG TTCAGCGTAA GGCTATCTCT GAACTGATCA AAGTTATGAA 350
CGACCTGTCT CCAAAGCTA ACCTGCGTAA ACGTAAACGT TCTCAGAACC 400
CATTCCGTGG TCGTCGTGCT CTTCAGTAA,

```

hvori R² betyr

```

ATGAATTATA CAAGTTTTAT CTGGCTTTT CAGCTGTGTG CGATTTTGGG 50
TCTTCTACCC AG,
ATGCAG,

```

eller CAG

eller redundante variasjoner av de nevnte DNA-sekvensene, hvilket DNA-molekyl er egnet for ekspresjon i *Echerichia coli* og er funksjonelt bundet til en ekspresjonskontrollsekvens.

2. Ekspresjonsvektor ifølge krav 1, karakterisert ved at tryptofan-promotoren er tryptofanpromotoren fra *Serratia marcescens*.

3. Ekspresjonsvektor ifølge krav 1 og 2, karakterisert ved at ekspresjonskontrollsekvensen er valgt fra gruppen bestående av

```

GAATTGACGC TGATCGCTAA AACATTGTGC AAAAAGAGGG TTGACATTGC 50
CTTCGCGAAC CAGTTAACTA GTACACAAGT TCACGGCTCG AGACGGTAAG 100
GAGGTTTAAT ATGAGCTCGA ATTCATCGAT,

```

og

```

GAATTGCCCG TTCTGGATAA TGTTTTTTGTC GCCGACATCA TCATGCTGAT 50
CGCTAAACA TTGTGCAAAA AGAGGGTTGA CATTGCCTTC GCGAACCAGT 100
TAACTAGTAC ACAAGTTCAC GGCTCGAGAC GGTAAGGAGG TTTAATATGA 150
GCTCGAATTC ATCGAT.

```

4. Vertsorganisme, karakterisert ved at den er transformert med ekspresjonsvektoren ifølge krav 1-3.

5. Vertsorganisme ifølge krav 4,
k a r a k t e r i s e r t v e d at den er Escherichia
coli.
6. Fremgangsmåte for fremstilling av et polypeptid med de
biologiske og immunologiske egenskapene til EqIFN- γ ,
k a r a k t e r i s e r t v e d at
- a) E. coli transformeres med en ekspresjonsvektor ifølge
krav 1-3 som koder for, og er istand til å uttrykke
dette polypeptid; og
 - b) denne transformerte E. coli mikroorganismen dyrkes, og
 - c) polypeptidet isoleres.

CCACAAGAATGGCACGGGTGGGCATAATGGGTCTGTCTCATCGTCAAAAGACCCAAGGAG 5
 TTGAAAGGAAACTCTAACTACAACACCAAAATGCCACAAAACCATAGTTATTAATACAAA 65
 CTA ACTAGCATCTGTGCCTATCTGTCCACCATCTCATCTGAAAAAACTTGTGAAAATACGT 125
 AATCCTGATGAGACTTCAATTAGGTATAAAAACCAGCCCCAGAAGGCGAGGCAGTACACT 185
 CTTCTGATCGCCGGTAGGGCAGCTATTAGAAAAGAAAGATCAGCTGAGGCCTTGGGACCT 245
 GATCAGCTTAGTACAGAAGTGACTGCTTTCAACTACTTAGGCCTAACTCTCTCCGAAACA 305
 365

-20 -15 -10
 Met Asn Tyr Thr Ser Phe Ile Leu Ala Phe Gln Leu Cys Ala Ile
 ATG AAT TAT ACA AGT TTT ATC TTG GCT TTT CAG CTG TGT GCG ATT 410

-5 -1 1 5 10
 Leu Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Cys Gln Ala Ala Phe Phe Lys Glu
 TTG GGT TCT TCT ACC TAT TAC TGC CAG GCC GCG TTT TTT AAA GAA 455

15
 Ile Glu Asn Leu Lys Glu Tyr Phe
 ATA GAA AAC CTA AAG GAA TAT TTT GTAAGTATGACCTTTTAATAACTTAC 507

I N T R O N 1

TTGTGGTTGAAATGACTGAACGTTGTCTTGGAGTTGGATCTCTGATAGGCTGTCCTCTCT 567
 ACTCCACAGTCATCTTGAGAAGACTGGGTGTTATTTTCTCTGTTTGTGACTGGATGAGT 627
 TTTTCTTTTCTTACTAAATGATCTAGATATTGCTTTAACCCCTCTGCTCAATTTGCTATA 687
 GAGACTTAGAGAGGGTTCATGAATCTTCCAAAAGATGGGCTTAACAGGTTTATAAAGCAT 747
 AGTGAAGTTGACAATTTTGTGGTGAGAAGCCACTGAATTGTGATAAGTCAAGTAGTGTGG 807
 ACATTGAAAATAATGACTAGCTATTAGTTTCTAACTTCTCAGGTTACTATGATGGTGACAA 867
 TAAAAGGTCAGATTAGCATTAAAATGGTAATCTGAAATAATTGATCAGTTAAAGAAGGC 927
 GCTGTCCTGAAAGGTTTGGCTGAAAAAAAATCACTTTTCAGGTGTTTTCTCCAAAAAATG 987
 ATTTTAAAACTTACTGCCCCGTTTGTGTTAGCTGTGAAGTACTCTGGAACCTCAGTCAAT 1047
 TGCTGAGATTTTGTACGAGTTATAAGCTGGCTTATATTTAAAAAATTTTTTTGTTTTTGT 1107
 TTTATGAGTTTCTTTTAAAATGTTATTTATGGTTAATTTAAAATAGTTTTTGCATTTTAAA 1167
 TATTTTATTATTTGTCCAAAATTTAGCTATTTTAATTATAGTTGGAGCTCTCTTTTAGAG 1227
 CTGACATAAGACCATAGGGGAGGCACAGATAGATGTGATGGAGCCCTGTACCAGACGGGG 1287
 GCAGTATCTTATAGTGGGTTGCCTTTGCTGATCTTTTTACTAGACTTGAAATTATTTGCT 1347
 TTTCTTCTATGTTATTTGGGACTATTGAAGTATCACCAGCCCTGTTGAGTTTCATCTG 1407
 TAATATTGTAATTCAAGGGTTACACTAGAAAAAAGAAAGCTAAAACAGCACGATAATCT 1467
 TTGGCTACATCCAACACAATAGCTTTTGGGAATACTTATTGTTAGAATAAACAGAGGGT 1527
 TGAAAAGAAAATCAGTGAATACTGTGAGTCAATAAAAACGTGAAGTACATTT 1587

20
 Asn Ala
 TTAGGGCAATTCATGGACTAATTGTAAACCAAGTTTTCTTCTTTTTCAG AAC GCA 1644

25 30 35
 Arg Asn Pro Asp Val Gly Asp Gly Gly Pro Leu Phe Leu Asp Ile
 AGA AAC CCA GAT GTA GGG GAT GGT GGG CCT CTT TTC CTG GAT ATC 1689

Fig. 1a

G A M M A - I N T E R F E R O N

SI	S10	S20	1	10	20	30	40	50	60	70
Menneske	MKYTSYILAFQLCIVLGSIG	CYCQDPYVKE	AENLKKEYFNA	GHSQVAO	NGT	LFLGILKNWK	EESDRKIMQS	QIVSFYFKLF	KNFKDDQSIQ	
Hest	MNYTSFILAFQLCAILGSST	YYCQAAFFKE	IENLKEYFNA	RNPQVGDGGP	LFLDILKNWK	EDSDKKIIS	QIVSFYFKLF	ENLKDNQVIQ		
Storfe	MKYTSYFLALLCGLLGFSG	SYGQGGFFRE	IENLKEYFNA	SSPDVAKGGP	LFSOILKNWK	DESDKKIIS	QIVSFYFKLF	ENLKDNQVIQ		
Mus	MNATHCILALQLFLMAV-SG	CYCHGTVIES	LESLNMYFNS	SGIDV-EEKS	LFLDIWRNWQ	KDGMKILQS	QIISFYLRLF	EVLKDNQVATS		
Rotte	MSATRRVLVLQLCLMAL-SG	CYCQGTILIES	LESLKNYFNS	SSMDAMEGKS	LLLDIWRNWQ	KDGNTKILES	QIISFYLRLF	EVLKDNQVATS		
Sam-	M--T---Ld--LC-----Sg	-Ycq-----	-E-Lk-YFN-	---Dv-----	Lfdl--NW-	---d-KI-qS	QI-SFY--LF	e-1KDNQ-I-		
stemmighet										

3P

Menneske	KSVETIKEDM	NVKFFNSMK	KRODFEKLIN	YSVTDLNVQR	KAIHELIVM	AELSPA	AKTG	KRKR	SQMLFR	GRRAFQ
Hest	KSMOTIKEDL	FVKFFNSSTS	KLEDFKLIQ	IPVNDLKVQR	KAISELIVM	NDLSPKANLR	KRKR	SQNPFR	GRRALQ	
Storfe	RSMOTIKQDM	FQKFLNGSSE	KLEDFKLIQ	IPVDDLQIQR	KAINELIVM	NDLSPKSNLR	KRKR	SQNLFR	GRRASM	
Mus	NNISVIESHL	ITTFNSKA	KKDAFMSIAK	FEVNPQVQR	QAFNELIRVV	HQLLPESSLR	KRKR	SRC		
Rotte	NNISVIESHL	ITNFFNSKA	KKDAFMSIAK	FEVNPQIQH	KAVNELIRVI	HQLSPESSLR	KRKR	SRC		
Sam-	-----I-----	---ff--s--	K---F-----	--V-----Qr	KA--ELJ-V-	--Lsp----	lr	KRKR	S---FR	GRRAA--
stemmighet										

180239

1 5 10 15
 Tyr Tyr Cys Gln Ala Ala Phe Phe Lys Glu Ile Glu Asn Leu Lys Glu Tyr
 _____ (1) _____
 _____ (15) _____
 5'- TAC TAC TGC CAG GCT GCT TTC TTT AAA GAA ATC GAA AAC CTG AAA GAA TAC 51
 3'- ATG ATG ACG GTC CGA CGA AAG AAA TTT CTT TAG CTT TTG GAC TTT CTT ATG
 _____ (16) _____
 _____ (2) _____

AheIII

20 25 30 35
 Phe Asn Ala Arg Asn Pro Asp Val Gly Asp Gly Gly Pro Leu Phe Leu Asp Ile
 _____ (1) _____ (3) _____
 _____ (15) _____
 TTC AAC GCT CGT AAC CCA GAC GTT GGT GAC GGT GGT CCG CTG TTC CTG GAC ATC 105
 AAG TTG CGA GCA TTG GGT CTG CAA CCA CTG CCA CCA GGC GAC AAG GAC CTG TAG
 _____ (16) _____ (4) _____
 _____ (2) _____

AvaII

40 45 50
 Leu Lys Asn Trp Lys Glu Asp Ser Asp Lys Lys Ile Ile Gln Ser Gln Ile Val
 _____ (3) _____ (5) _____
 CTG AAA AAC TGG AAA GAA GAC TCT GAC AAA AAG ATC ATC CAG TCT CAG ATC GTT 159
 GAC TTT TTG ACC TTT CTT CTG AGA CTG TTT TTC TAG TAG GTC AGA GTC TAG CAA
 _____ (4) _____ (6) _____

55 60 65 70
 Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Glu Asn Leu Lys Asp Asn Gln Val Ile Gln Lys
 _____ (5) _____ (7) _____
 TCT TTC TAC TTC AAA CTG TTC GAA AAC CTG AAA GAC AAC CAG GTT ATC CAG AAA 213
 AGA AAG ATG AAG TTT GAC AAG CTT TTG GAC TTT CTG TTG GTC CAA TAG GTC TTT
 _____ (6) _____ (8) _____

75 80 85
 Ser Met Asp Thr Ile Lys Glu Asp Leu Phe Val Lys Phe Phe Asn Ser Ser Thr
 _____ (7) _____ (9) _____
 TCG ATG GAC ACT ATC AAA GAA GAT CTG TTC GTT AAA TTC TTC AAC TCG TCG ACT 267
 AGC TAC CTG TGA TAG TTT CTT CTA GAC AAG CAA TTT AAG AAG TTG AGC AGC TGA
 _____ (8) _____ (10) _____
 ClaI BglIII Sall

90 95 100 105
 Ser Lys Leu Glu Asp Phe Gln Lys Leu Ile Gln Ile Pro Val Asn Asp Leu Lys
 _____ (9) _____
 TCT AAA CTG GAA GAC TTC CAG AAA CTG ATC CAG ATC CCA GTT AAC GAC CTG AAA 321
 AGA TTT GAC CTT CTG AAG GTC TTT GAC TAG GTC TAG GGT CAA TTG CTG GAC TTT
 _____ (10) _____

110 115 120 125
 Val Gln Arg Lys Ala Ile Ser Glu Leu Ile Lys Val Met Asn Asp Leu Ser Pro
 _____ (11) _____
 GTT CAG CGT AAG GCT ATC TCT GAA CTG ATC AAA GTT ATG AAC GAC CTG TCT CCA 375
 CAA GTC GCA TTC CGA TAG AGA CTT GAC TAG TTT CAA TAC TTG CTG GAC AGA GGT
 _____ (10) _____ (12) _____

130 135 140
 Lys Ala Asn Leu Arg Lys Arg Lys Arg Ser Gln Asn Pro Phe Arg Gly Arg Arg
 _____ (11) _____ (13) _____
 AAA GCT AAC CTG CGT AAA CGT AAA CGT TCT CAG AAC CCA TTC CGT GGT CGT CGT 429
 TTT CGA TTG GAC GCA TTT GCA TTT GCA AGA GTC TTG GGT AAG GCA CCA GCA GCA
 _____ (12) _____ (14) _____

145
 Ala Leu Gln ***
 _____ (13) _____
 GCT CTT CAG TAA G -3'
 CGA GAA GTC ATT CCTAG -5' 442
 _____ (14) _____ 446
 BamHI

Fig. 3

	1		5		10		15													
eq	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Ala	Ala	Phe	Phe	Lys	Glu	Ile	Glu	Asn	Leu	Lys	Glu	Tyr	Phe		
	TAT	TAC	TGC	CAG	GCC	GCG	TTT	TTT	AAA	GAA	ATA	GAA	AAC	CTA	AAG	GAA	TAT	TTT		
	*				*	*	*				*			*	*		*	*		
syn	TAC	TAC	TGC	CAG	GCT	GCT	TTC	TTT	AAA	GAA	ATC	GAA	AAC	CTG	AAA	GAA	TAC	TTC		
		20				25					30					35				
eq	Asn	Ala	Arg	Asn	Pro	Asp	Val	Gly	Asp	Gly	Gly	Pro	Leu	Phe	Leu	Asp	Ile	Leu		
	AAC	GCA	AGA	AAC	CCA	GAT	GTA	GGG	GAT	GGT	GGG	CCT	CTT	TTC	CTG	GAT	ATC	TTG		
	*	*	*			*	*	*	*		*	*	*		*	*	*	*		
syn	AAC	GCT	CGT	AAC	CCA	GAC	GTT	GGT	GAC	GGT	GGT	CCG	CTG	TTC	CTG	GAC	ATC	CTG		
			40				45					50								
eq	Lys	Asn	Trp	Lys	Glu	Asp	Ser	Asp	Lys	Lys	Ile	Ile	Gln	Ser	Gln	Ile	Val	Ser		
	AAG	AAC	TGG	AAA	GAG	GAT	AGT	GAC	AAA	AAA	ATA	ATT	CAG	AGC	CAA	ATC	GTC	TCC		
	*				*	*	**			*	*	*		***	*		*	*		
syn	AAA	AAC	TGG	AAA	GAA	GAC	TCT	GAC	AAA	AAG	ATC	ATC	CAG	TCT	CAG	ATC	GTT	TCT		
		55				60					65				70					
eq	Phe	Tyr	Phe	Lys	Leu	Phe	Glu	Asn	Leu	Lys	Asp	Asn	Gln	Val	Ile	Gln	Lys	Ser		
	TTC	TAC	TTC	AAA	CTC	TTT	GAA	AAC	TTG	AAA	GAT	AAC	CAG	GTC	ATT	CAA	AAG	AGC		
					*	*			*		*			*	*	*	*	***		
syn	TTC	TAC	TTC	AAA	CTG	TTC	GAA	AAC	CTG	AAA	GAC	AAC	CAG	GTT	ATC	CAG	AAA	TCG		
			75				80					85				90				
eq	Met	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Asp	Leu	Phe	Val	Lys	Phe	Phe	Asn	Ser	Ser	Thr	Ser		
	ATG	GAC	ACC	ATC	AAG	GAG	GAC	CTG	TTC	GTT	AAG	TTC	TTT	AAC	AGC	AGC	ACC	AGC		
			*		*	*	*				*		*		***	***	*	***		
syn	ATG	GAC	ACT	ATC	AAA	GAA	GAT	CTG	TTC	GTT	AAA	TTC	TTC	AAC	TCG	TCG	ACT	TCT		
				95				100						105						
eq	Lys	Leu	Glu	Asp	Phe	Gln	Lys	Leu	Ile	Gln	Ile	Pro	Val	Asn	Asp	Leu	Lys	Val		
	AAG	CTG	GAA	GAC	TTC	CAA	AAG	CTG	ATT	CAG	ATT	CCG	GTA	AAT	GAT	CTG	AAG	GTC		
	*					*	*		*		*	*	*	*	*	*	*	*		
syn	AAA	CTG	GAA	GAC	TTC	CAG	AAA	CTG	ATC	CAG	ATC	CCA	GTT	AAC	GAC	CTG	AAA	GTT		
		110				115						120				125				
eq	Gln	Arg	Lys	Ala	Ile	Ser	Glu	Leu	Ile	Lys	Val	Met	Asn	Asp	Leu	Ser	Pro	Lys		
	CAG	CGC	AAA	GCA	ATA	AGT	GAA	CTC	ATC	AAA	GTG	ATG	AAT	GAT	CTG	TCG	CCC	AAA		
	*	*	*	*	*	**		*		*	*		*	*	*	*	*	*		
syn	CAG	CGT	AAG	GCT	ATC	TCT	GAA	CTG	ATC	AAA	GTT	ATG	AAC	GAC	CTG	TCT	CCA	AAA		
			130				135							140						
eq	Ala	Asn	Leu	Arg	Lys	Arg	Lys	Arg	Ser	Gln	Asn	Pro	Phe	Arg	Gly	Arg	Arg	Ala		
	GCT	AAC	CTG	AGG	AAG	CGG	AAG	AGG	AGT	CAG	AAT	CCA	TTT	CGA	GGC	CGG	AGA	GCG		
				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
syn	GCT	AAC	CTG	CGT	AAA	CGT	AAA	CGT	TCT	CAG	AAC	CCA	TTC	CGT	GGT	CGT	CGT	GCT		
		145																		
eq	Leu	Gln	***																	
	TTG	CAA	TAG																	
	*	*	*	*																
syn	CTT	CAG	TAA																	

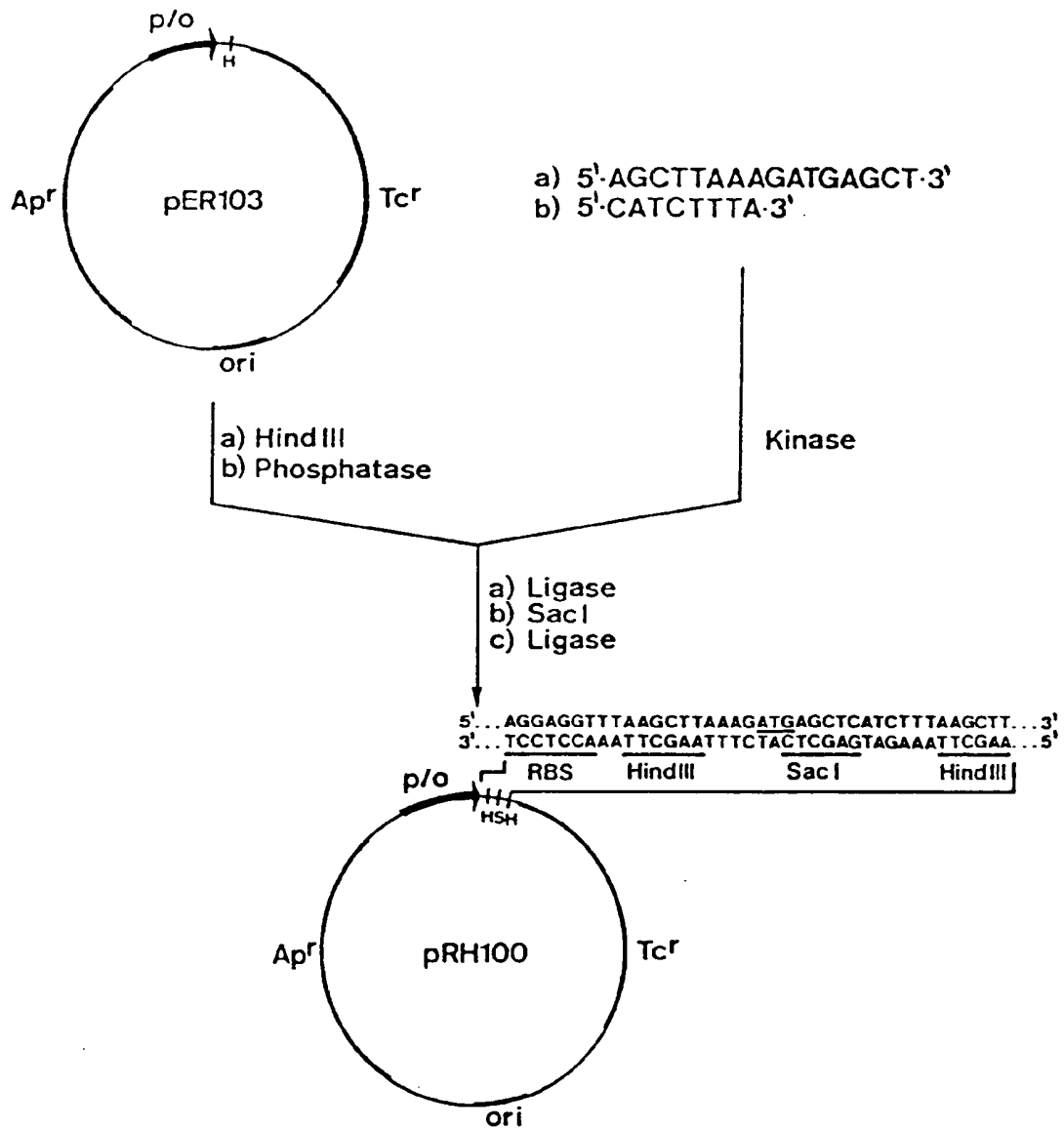
Fig. 4

180239

Kodon anvendelse av fullstendig EqIFN-gamma: Naturlig gen
(Syntetisk gen)

	T			C			A			G			
T	6	(1)	Phe	0	(7)	Ser	2	(0)	Tyr	0	(0)	Cys	T
	6	(11)	Phe	1	(0)	Ser	2	(4)	Tyr	1	(1)	Cys	C
	0	(0)	Leu	0	(0)	Ser	0	(1)	STOP	0	(0)	STOP	A
	3	(0)	Leu	1	(3)	Ser	1	(0)	STOP	1	(1)	Trp	G
C	1	(1)	Leu	1	(0)	Pro	0	(0)	His	0	(8)	Arg	T
	2	(0)	Leu	1	(0)	Pro	0	(0)	His	1	(0)	Arg	C
	1	(0)	Leu	2	(4)	Pro	4	(0)	Gln	1	(0)	Arg	A
	7	(13)	Leu	1	(1)	Pro	6	(10)	Gln	2	(0)	Arg	G
A	4	(0)	Ile	0	(2)	Thr	3	(0)	Asn	3	(0)	Ser	T
	4	(11)	Ile	2	(0)	Thr	8	(11)	Asn	5	(0)	Ser	C
	3	(0)	Ile	0	(0)	Thr	9	(17)	Lys	2	(0)	Arg	A
	2	(2)	Met	0	(0)	Thr	10	(2)	Lys	2	(0)	Arg	G
G	1	(7)	Val	1	(6)	Ala	7	(1)	Asp	1	(4)	Gly	T
	3	(0)	Val	1	(0)	Ala	4	(10)	Asp	1	(0)	Gly	C
	2	(0)	Val	2	(0)	Ala	6	(8)	Glu	0	(0)	Gly	A
	1	(0)	Val	2	(0)	Ala	2	(0)	Glu	2	(0)	Gly	G

Fig. 5



H: HindIII, S: SacI

Ap^r: Ampicillin resistensgen

Tc^r: Tetracyclin resistensgen

ori: replikasjonsstart

RBS: ribosom -binding sete

p/o: tryptofan-promotor/operator

180239

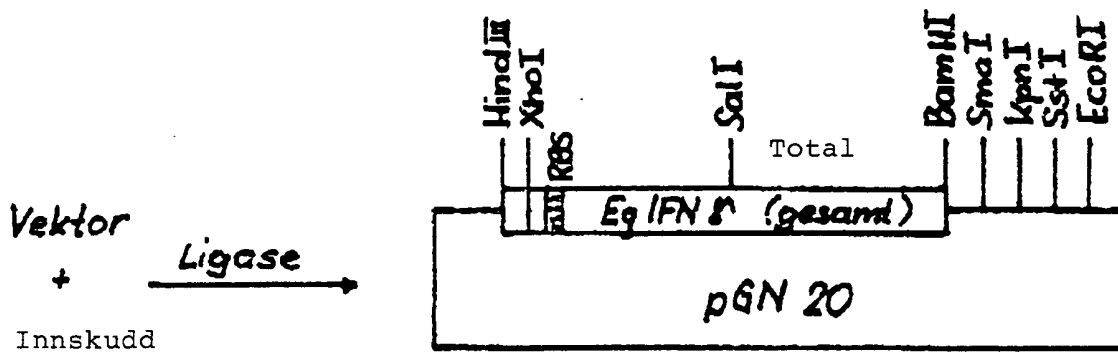
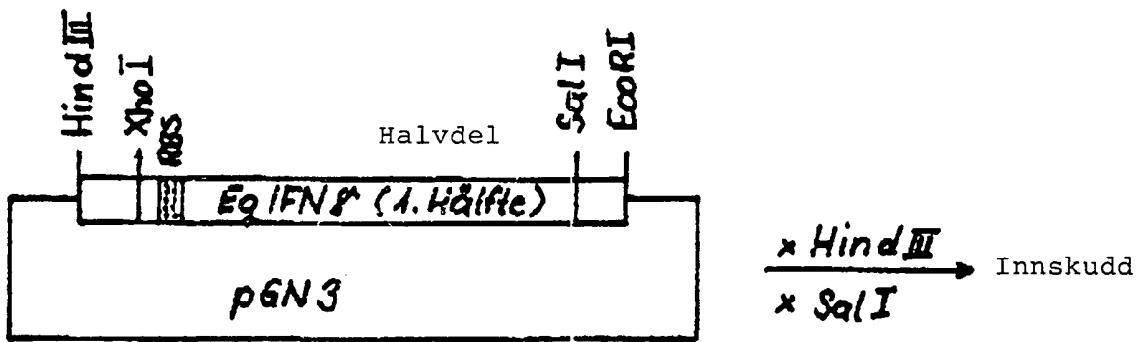
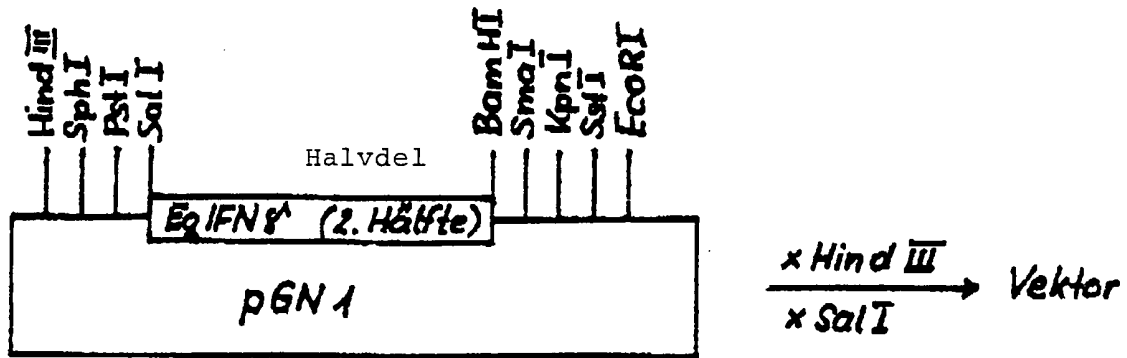


Fig. 7