



FI000099116B

(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT

99116

SUOMI-FINLAND

(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(51) Kv.lk.6 - Int.cl.6

C 07K 14/57, C 12N 15/23, A 61K 38/21

(21) Patenttihakemus - Patentansökning 875427

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 10.12.87

(24) Alkupäivä - Löpdag 10.12.87

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 11.06.88

(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 30.06.97

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

10.12.86 DE 3642096 P

(71) Hakija - Sökande

1. Boehringer Ingelheim International GmbH, 6507 Ingelheim am Rhein, Germany, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Hauptmann, Rudolf, Döllachstrasse 22, 2483 Ebreichsdorf, Österreich, (AT)
2. Himmeler, Adolf, 800 Memorial Drive 25, South San Francisco, CA 94080, USA, (US)
3. Swetly, Peter, Hietzinger Hauptstrasse 40B, 1130 Wien, Österreich, (AT)

(74) Asiamies - Ombud: Leitzinger Oy

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Menetelmä valmistaa hevosen γ -interferonia
Förfarande för att framställa häst γ -interferon

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 186098 (C 12N 15/00), EP A 161504 (C 07K 7/10), EP A 115613 (C1 2N 15/00),
Journal of Interferon Research vol. 2 (1982) pp 363-370

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Käsillä olevan keksinnön kohteena on menetelmä valmistaa hevos-interferoni-gammaa (hevosen interferoni-gamma, EqIFN- γ), tätä polypeptidiä koodaavat DNA-sekvenssit, näitä DNA-sekvenssejä sisältävät sopivat vektorit ja isäntäorganismit sekä itse EqIFN- γ . Keksinnön kohteena ovat edelleen DNA-osasekvenssit, jotka koodaavat polypeptidejä, jotka erovat rakenteellisesti luonnonmukaisesta EqIFN- γ -polypeptidistä. Myös proteiinien käyttö on kuvattu.

Uppfinningen avser ett förfarande för framställning av häst-interferon-gamma (EqIFN- γ), denna polypeptid kodande DNA-sekvenser, dessa DNA-sekvenser innehållande lämpliga vektorer och värdorganismer samt EqIFN- γ själv. Uppfinningen avser desutom DNA-delsekvenser som kodar polypeptider, vilka strukturellt skiljer sig från den naturliga EqIFN- γ -polypeptiden. Även proteinernas användning beskrives.

Menetelmä valmistaa hevosen γ -interferonia

Käsillä olevan keksinnön kohteena on menetelmä valmistaa hevosen γ -interferonia (hevosinterferoni- γ , EqIFN- γ), tätä polypeptidiä koodaavat DNA-sekvenssit, näitä DNA-sekvenssejä sisältävät sopivat vektorit ja isäntäorganismit sekä itse EqIFN- γ .
Käsillä olevan keksinnön kohteena ovat edelleen DNA-osasekvenssit, jotka koodaavat polypeptidejä, jotka eroavat rakenteellisesti luonnonmukaisesta EqIFN- γ -polypeptidistä. Kuvauksen kohteena on myös proteiinien käyttö.

Interferonit ovat proteiineja, joita erittyy eukaroyttisoluisista virusinfektioiden ja muiden ärsytysten jälkeen ja jotka toisaalta voivat suojata soluja virusinfektiolta. Toistaiseksi tunnetaan kolme interferoniluokkaa: näistä käytetään nimityksiä interferoni- α , interferoni- β ja interferoni- γ (lyhennettynä IFN- α , IFN- β ja IFN- γ). Nämä eroavat toisistaan rakenteeltaan ja vaikutuksiltaan. Interferonit voivat siten vaikuttaa immuunijärjestelmän soluja tai myös soluen erikoistumista ja tuumorin kasvua säätelevästi.

F. Wheelock löysi 965 polypeptidin, joka suojasi määrättyjä soluja virusinfektioilta (Science 149, 310 (1965)). Polypeptidejä, joilla on nämä ominaisuudet, kutsutaan nimillä imuuni-interferoni, tyyppin II interferoni, interferoni- γ tai IFN- γ , vaikkakin tällöin on kysymys lymfokineeneihin lukeutuvasta polypeptidiluokasta. γ -ihmisinterferonin lisäksi tunnetaan tähän mennessä naudan, hiiren ja rotan γ -interferonit. Kaikki tähän mennessä tunnetuksi tulleet γ -interferonit ovat glykolysoidussa muodossa, jolloin glykolysoitumisella ei kuitenkaan ole mitään vaikutusta biologiseen aktiivisuuteen (Keller et al., J. Biol. Chem. 258, 8010 (1983)).

Interferonien uskottiin kauan vaikuttavan lajispesifisesti. In vitro -kokeet kuitenkin osoittivat, että nautojen IFN-preparaatit saattoivat laukaista antiviraalisen vaikutuksen apinoilla

ja ihmisillä (Tovey, M.G. et al. J. Gen. Virol 36, 341-344 (1977)). Tämä lajien välinen aktiivisuus riippuu mahdollisesti geenien tai proteiinien enemmän tai vähemmän suuresta homologiasta: tätä olettamusta ei ole voitu todistaa eläinperäisten interferonien vähäisen määrän vuoksi.

Todetusta lajien välisestä aktiivisuudesta huolimatta on vieraan lajin interferoneja käytettäessä otettava huomioon sivuvaikutukset kuten antigeenisuus, jotka hoidon kannalta eivät ole sallittavia.

Koska toisaalta kuitenkin hyötyeläinten ja kotieläinten hoidolla on merkittävä taloudellinen arvo, eri lajeille tarvitaan interferoneja, joita eläinlääkärit voivat käyttää.

15

Eri lajien pitkälle puhdistettu eläininterferoni tarjoaa lisäksi tervetulleen tilaisuuden tutkia interferonien vaikutusmekanismeja ja saada näin malleja, jotka voidaan siirtää ihmisiin.

...

20

...

...

...

...

...

25

...

...

...

...

...

...

...

...

30

Rekombinantti-DNA-tekniikan kehittymisen kautta on mahdollista tuottaa mikro-organismeilla heterologisia proteiineja. Näin on valmistettu esimerkiksi myös ihmisinterferoneja (Hu-IFN); viime aikoina myös erilaisia ei-ihmisperäisiä interferoneja.

Käsillä olevan keksinnön kohteena oli valmistaa geeniteknologista tietä hevosen γ -interferonia ja tähän tarvittavia DNA-sekvenssejä.

35 Huomionarvoista on se, että EqIFN- γ :aa kuten myös kaikkia tähän mennessä tunnetuiksi tulleita γ -interferoneja koodaa kyseisessä

organismissa yksi geeni, jossa on suurimmat sekvenssit, jotka katkaisevat rakennegeenin: geenit muodostuvat eksoneista ja introneista, jolloin vain eksonit koodaavat proteiinia. Vain määrättyt systeemit, esimerkiksi systeemit nisäkässoluissa voivat ymmärtää introneja. Introneja sisältävät DNA-sekvenssejä ei voida käyttää muissa systeemeissä, esimerkiksi E.colissa.

Käsillä olevan keksinnön tavoitteena oli siten valmistaa EqIFN- γ :aa koodaava, introneja sisältämätön DNA-sekvenssi.

10

Keksinnön mukainen DNA-molekyyli tunnetaan siitä, että se käsittää hevos-interferoni- γ :aa koodaavan sekvenssin:

```

      R1 TAC TGC CAG GCT GCT TTC TTT AAA GAA ATC GAA AAC CTG AAA
15 GAA TAC TTC AAC GCT CGT AAC CCA GAC GTT GGT GAC GGT GGT CCG
   CTG TTC CTG GAC ATC CTG AAA AAC TGG AAA GAA GAC TCT GAC AAA
   AAG ATC ATC CAG TCT CAG ATC GTT TCT TTC TAC TTC AAA CTG TTC
   GAA AAC CTG AAA GAC AAC CAG GTT ATC CAG AAA TCG ATG GAC ACT
   ATC AAA GAA GAT CTG TTC GTT AAA TTC TTC AAC TCG TCG ACT TCT
20 AAA CTG GAA GAC TTC CAG AAA CTG ATC CAG ATC CCA GTT AAC GAC
   CTG AAA GTT CAG CGT AAG GCT ATC TCT GAA CTG ATC AAA GTT ATG
   AAC GAC CTG TCT CCA AAA GCT AAC CTG CGT AAA CGT AAA CGT TCT
   CAG AAG CCA TTC CGT GGT CGT CGT GCT CTT CAG TAA

```

25 tai

```

      R2 GCT GCT TTC TTT AAA GAA ATC GAA AAC CTG AAA GAA TAC TTC
AAC GCT CGT AAC CCA GAC GTT GGT GAC GGT GGT CCG CTG TTC CTG
GAC ATC CTG AAA AAC TGG AAA GAA GAC TCT GAC AAA AAG ATC ATC
30 CAG TCT CAG ATC GTT TCT TTC TAC TTC AAA CTG TTC GAA AAC CTG
   AAA GAC AAC CAG GTT ATC CAG AAA TCG ATG GAC ACT ATC AAA GAA
   GAT CTG TTC GTT AAA TTC TTC AAC TCG TCG ACT TCT AAA CTG GAA
   GAC TTC CAG AAA CTG ATC CAG ATC CCA GTT AAC GAC CTG AAA GTT
   CAG CGT AAG GCT ATC TCT GAA CTG ATC AAA GTT ATG AAC GAC CTG
35 TCT CCA AAA GCT AAC CTG CGT AAA CGT AAA CGT TCT CAG AAC CCA
   TTC CGT GGT CGT CGT GCT CTT CAG TAA

```

jolloin R^1 on

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

5

ATG TAT tai

TAT,

10 R^2

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

15 ATG CAG tai

CAG.

20 Tällaisen signaalisekvenssin avulla saadaan määrätyissä isäntä-
organismeissa aikaan halutun polypeptidin erittyminen sytoplas-
masta. Tällöin proteiini prosessoidaan ja signaaliptidi loh-
kaistaan; saadaan valmis proteiini. "Keskeneräisen" polypepti-
din eristämiseksi on hajotettava isäntäorganismin, esimerkiksi
E.coli-bakteerin solut, jotka eivät kykene prosessoimaan poly-
peptidejä, jotka sisältävät signaaliptidisekvenssin. Käsillä
25 olevan keksinnön kohteena ovat myös nämä "keskeneräiset"
EqIFN- γ :t, joissa on täydelliset tai epätäydelliset signaali-
ptidisekvenssit.

30 Valmiin EqIFN- γ :n saamista varten voidaan aloitusmetioniini
erottaa sinänsä tunnetuilla menetelmillä, esimerkiksi CNBr:lla
tai CNCl:lla.

35 Tämä EqIFN- γ :aa koodaava DNA-sekvenssi sisältää kuitenkin vain
sellaisia kodoneja, joita E.coli käyttää voimakkaasti ekspres-

soiduissa, soluille ominaisissa geeneissä (Gouy ja Gautier, Nucl. Acids Res. 10, 7055 (1982)).

Käsillä olevan keksinnön tavoitteena oli edelleen valmistaa
5 ensi kertaa EqIFN-γ:aa homogeenisessa, puhtaassa muodossa:

Edellä jo mainittiin, että EqIFN-γ:n eristäminen ja puhdistami-
nen luonnonmukaisesta solumateriaalista ei sovi tämän tavoit-
teen tyydyttävään saavuttamiseen. Keksinnön mukaisesti käyte-
10 tään tämän tavoitteen saavuttamiseen siten keksinnön mukaisia
DNA-sekvenssejä. Nämä sekvenssit varustetaan vastaavilla kont-
rollisekvensseillä, liitetään sopiviin vektoreihin ja viljel-
lään näillä transformoituja sopivia isäntäorganismeja tai isän-
täsoluviljelmiä. Muodostuneet polypeptidit eristetään ja puh-
15 distetaan sinänsä tunnetuilla menetelmillä.

Saadut polypeptidit vastaavat seuraavia kaavoja:

	1	5	10	15
20	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
25		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
30	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
35		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 ***	

Kaava V

tai

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
 5 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
 10 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 ***

Kaava Va

15 Kromosomaalista sekvenssiä käytettäessä saadaan nisäkässolujen
 transformoinnin jälkeen EqIFN- γ luonnossa esiintyvässä, glyko-
 lysoidussa muodossa (autenttinen EqIFN- γ). Keksinnön mukaiset
 sekvenssit ovat erityisen sopivia valmistettaessa EqIFN- γ :aa
 mikro-organismeissa, erityisesti valmistettaessa EqIFN- γ :aa
 20 E.coli-bakteerissa, jolloin polypeptidi ekspressoituu glykoly-
 soitumattomassa muodossa.

Käsillä olevan keksinnön tavoitteena oli edelleen valmistaa
 luonnon EqIFN- γ :n modifikaatioita.

25

Proteiinin modifikaatioita voidaan valmistaa siten, että esi-
 merkiksi joko proteiini derivatisoidaan tai pilkotaan entsyymi-
 käsittelyllä tai proteiinia koodaava DNA-sekvenssi modifioidaan
 deletoimalla tai fragmentoimalla ja tämä sekvenssi saatetaan
 30 ekspressoimaan sopivassa isäntäorganismissa.

Keksinnön mukaisesti syntetisoidaan kemiallisesti EqIFN- γ :n
 modifiointia koodaavat DNA-sekvenssit. Jotta yksittäisten osien
 muuttamista varten olisi mahdollista manipuloida geeniä yksin-
 35 kertaisesti, rakennetaan täydelliseen DNA-sekvenssiin useita
 ainutkertaisia restriktioentsyymien katkaisukohtia.

EqIFN- γ :n muita modifioituja muotoja voidaan keksinnön mukaisesti saada siten, että erilaisia oligonukleotidejä rakennetaan yksinään tai erilaisina yhdistelminä, joissa on vastaavat kontrollisekvenssit, sopiviin vektoreihin, viljellään näillä transformoituja isäntäorganismeja ja eristetään ja puhdistetaan muodostuneet proteiinit.

Asetettujen tavoitteiden saavuttamista varten eristettiin Blinin ja Staffordin modifioidulla menetelmällä (Blin, N.; Staffod, P.W. Nucl. Acids Res. (1976), 3 (2303-2308)) suurimolekyylistä DNA:ta hevosen kudoksesta, parhaiten maksasta ja pilkottiin tilastollisesti erityisen endonukleaasien avulla. Näin saadut eri kokoiset fragmentit fraktioitiin koon perusteella, parhaiten jotta muodostuisi 10 - 23 kb fragmentteja ja jotta voitaisiin kloonata vektoriin, esimerkiksi Lambda-vektoriin, esimerkiksi Lambda EMBL3A-vektoriin. Tämän jälkeen näitä vektoreita kasvatettiin isäntäorganismissa, esimerkiksi E.coli-bakteerissa, transformoinnin jälkeen. Tämä hevos-DNA-kirjasto tutkittiin ihmisen " γ -interferoni-koettimen" avulla epästrigenteissa hybridisointiolosuhteissa. Alhainen stringenttiys mahdollistaa sellaisten DNA-sekvenssien löytämisen, joilla on ero ja "koettimeen" nähden.

Se voidaan valmistaa joko pilkkomalla kirjallisuudesta tunnettujen plasmideja restriktioentsyymien avulla tai syntetisoimalla kemiallisesti sinänsä tunnetuilla oligonukleotidien synteesimenetelmillä. Tällä "koettimella" on HuIFN- γ :aa koodaava sekvenssi. Positiivisia hybridisointisignaaleja antavia Lambda-klooneja voitiin tunnistaa viisi.

Näistä eristetyistä rekombinantti-faageista puhdistettiin DNA tavanomaisilla menetelmillä. Faagi-DNA:t karakterisoitiin hybridisoimalla "HuIFN- γ -koettimen" kanssa sen jälkeen kun ne oli pilkottu eri restriktioentsymeillä ja tämän jälkeen analysoitu Southern-menetelmällä (Southern, J.Mol. Biol. 98: 503-517, 1975). Eristettiin yksi Lambda Eq- γ 2-kloonin ainutkertaisesti

hybridisoituva 4,6 kb pitkä BamHI-fragmentti ja kloonattiin pUC9-plasmidin (Vieira ja Messing, Gene 19: 259-268, 1982) Bam-Hi-katkaisukohtaa.

- 5 E.coli-bakteerin, esimerkiksi JM101-kannan transformoinnin jälkeen valmistettiin saaduista pesäkkeistä plasmidi-DNA:ta mini-valmistusmenetelmällä (Birnboim ja Doly, Nucl. Acids Res. 7: 1513-1423, 1979) ja karakterisoitiin pilkkomalla restriktioentsyymeillä. Plasmidille, jossa on haluttu BamHI-insertti, annettiin nimeksi pAH111. M13mp8- tai M13mp9-vektoreihin (Vieira ja Messing, Gene 19, 259-268, 1982) viemisen jälkeen sekvensoitiin pAH111-plasmidin BamHI-insertin päätä Didesoxy-menetelmällä (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977). Sekvenssien vertaaminen ihmisen γ -interferoni-geenin kanssa (Gray ja Goeddel, Nature 298: 859-863, 1982) osoitti homologien olevan suuren ei-koodaavien 5'- ja 3'-alueiden kanssa. Tästä voitiin päätellä, että oli eristetty täydellinen EqIFN- γ -geeni.

- 20 Plasmidin pAH111 4,6 kb pitkä BamHI-insertti sekvensoitiin täydellisesti Didesoxy-menetelmällä. BamHI-fragmentin koko sekvenssi saatiin yhdistämällä M13-alikloonien osasekvenssejä, jotka oli saatu kloonamalla restriktiofragmentit (EcoRI, HindIII, PstI, PstI-BglII, HindIII-BamHI) suunnatulla tavalla vastaavasti katkaistuihin M13mp8- tai M13mp9-vektoreihin.
- 25 Osasekvenssejä saatiin lisää siten, että 2,0 kb pitkä BamHI-BglII-fragmentti tai 2,0 kb pitkä PstI-fragmentti kloonattiin Mm13mp8-vektoriin "haulikkomenetelmällä". Saadut osasekvenssit yhdistettiin tietokoneohjelman avulla 4664 bp pitkäksi kokonaissekvenssiksi, joka on esitetty kuviossa 1.

- 30 Hevosen γ -interferonigeenin proteiinia koodaava alue saatiin analysoimalla avoin lukukehys tietokoneen avulla ja vertaamalla muiden lajien γ -interferonigeeneihin (Gray ja Goeddel, Nature 298: 859-863; Gray ja 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). Proteiinia koodaavan alueen katkaisee kolme intronia, jolloin ensimmäisessä eksonissa on koodattu 20 aminohappoa pitkä, hydrofobinen signaaliptidi ja valmiin EqIFN- γ -polypeptidin 18 aminohappoa (emäkset 366-479). Toinen eksoni koodaa aminohappoja 19-41 (emäkset 1639-1707), kolmas eksoni koodaa aminohappoja 42-102 (emäkset 1803-1985), neljäs eksoni koodaa karboksi-päättä, jossa on aminohapot 103-146 (emäkset 3307-3441). mRNA:n polyadenylaation kaksi signaalisekvenssiä (AATAAA) ovat asemissa 4010 ja 4020. Valmiin EqIFN- γ -polypeptidin asemissa 86-88 on ainut mahdollinen N-glykolysoitumiskohta (Asn-Ser-Ser), joka osuu yhteen naudan γ -interferonin toisen N-glykolysoitumiskohdan (Asn-Gly-Ser) kanssa (kuvio 2). Valmis EqIFN- γ -polypeptidi sisältää yllättäen vain yhden ainoan kysteiiniryhmän asemassa 3, jolloin luonnonmukaisten ihmisen ja hiiren γ -interferonien kanssa analogisesti ensimmäiset kolme amino-terminaalista aminohappo (tässä tapauksessa Tyr-Tyr-Cyr) todennäköisesti lohkeavat kehossa proteolyttisesti.

Jotta rekombinantti EqIFN- γ voisi ekspressoitua valmiissa muodossaan *Escherichia coli* -bakteerissa, rakennettiin oligonukleotideista synteettinen geeni. Se koodaa samaa aminohapposekvenssiä kuin luonnon EqIFN- γ -geeni, mutta sisältää kuitenkin ainoastaan sellaisia yksittäisten aminohappojen kodoneja, joita käytetään *E. coli* runsaasti ekspressoimissa, solujen omissa geeneissä (Gouy ja Gautier, Nucl. Acids Res. 10: 7055-7074, 1982). Lisäksi rakennettiin mukaan useita ainutkertaisia restriktioentsyymien katkaisukohtia, jotka mahdollistavat geenin yksinkertaisen manipuloinnin yksittäisten osien muuttamista varten. Synteettinen geeni EqIFN- γ :aa varten rakennettiin kahdena muunnelmana yhteensä 16:ta erilaisesta oligonukleotidista. Ensimmäinen muunnos koodaa valmista EqIFN- γ :aa, jossa on 146 aminohappoa ja aloitusmetioniini, toinen muoto koodaa aminopäässä kolmen aminohapon verran (Tyr-Tyr-Cys) lyhennettyä polypeptidiä ja aloitusmetioniinia muodossa, jossa se luultavasti luonnon organismissa esiintyisi.

Synteettisen EqIFN- γ -geenin rakenne on esitetty kuviossa 3. Valmistamiseen käytetyt oligonukleotidit syntetisoitiin Applied Biosystems Model 381A DNA-syntetisointilaitteen avulla ja puhdistaminen ja suolojen poisto suoritettiin elektroforeesin avulla. Kuviossa 3 esitetyillä oligonukleotideilla on seuraavat rakenteet:

EG-1 5'-TACTACTGCC AGGCTGCTTT CTTTAAAGAA ATCGAAAACC TGAAAGAATA
CTTCAACGCT CG-3'

10 EG-2 5'-TTGAAGTATT CTTTCAGGTT TTCGATTTCT TTAAAGAAAG CAGCCTGGCA
GTAGTA-3'

EG-3 5'-TAACCCAGAC GTTGGTGACG GTGGTCCGCT GTTCCTGGAC ATCCTGAAAA
ACTGGAAAGA AGACTCTG-3'

EG-4 5'-TTCTTTCCAG TTTTTCAGGA TGTCCAGGAA CAGCGGACCA CCGTCACCAA
15 CGTCTGGGTT ACGAGCG-3'

EG-5 5'-ACAAAAAGAT CATCCAGTCT CAGATCGTTT CTTTCTACTT CAAACTGTTC
GAAAACCTGA AAGACAACC-3'

EG-6 5'-TTTCAGGTTT TCGAACAGTT TGAAGTAGAA AGAAACGATC TGAGACTGGA
TGATCTTTTTT GTCAGAGTC-3'

20 EG-7 5'-AGGTTATCCA GAAATCGATG GACACTATCA AAGAAGATCT GTTCGTAAAA
TTCTTCAACT CG-3'

EG-8 5'-TCGACGAGTT GAAGAATTTA ACGAACAGAT CTTCTTTGAT AGTGTCCATC
GATTTCTGGA TAACCTGGTT GTC-3'

EG-9 5'-TCGACTTCTA AACTGGAAGA CTTCCAGAAA CTGATCCAGA TCCCAGTTAA
25 CGACCTGAAA-3'

EG-10 5'-GCTGAACTTT CAGGTCGTTA ACTGGGATCT GGATCAGTTT CTGGAAGTCT
TCCAGTTTAG AAG-3'

EG-11 5'-G TTCAGCGTA AGGCTATCTC TGAAGTATGA ACGACCTGTC
TCCAAAAGCT AA-3'

30 EG-12 5'-CGCAGGTTAG CTTTGGGAGA CAGGTCGTTC ATAAC TTTGA TCAGTTCAGA
GATAGCCTTA C-3'

EG-13 5'-CCTGCGTAAA CGTAAACGTT CTCAGAACCC ATTCCGTGGT CGTCGTGCTC
TTCAGTAAG-3'

EG-14 5'-GATCCTTACT GAAGAGCACG ACGACCACGG AATGGGTTCT GAGAACGTTT
35 ACGTTTA-3'

EG-15 5'-CAGGCTGCTT TCTTTAAAGA AATCGAAAAC CTGAAAGAAT ACTTCAACGC
TCG-3'

EG-16 5'-TTGAAGTATT CTTTCAGGTT TTCGATTTCT TTAAAGAAAG CAGCCTG-3'

5 Synteettisen EqIFN- γ -geenin kokoaminen tapahtui kahtena palana. Geenin ensimmäinen osa valmistettiin kahdeksan oligonukleotidin EG-1 - EG-8 avulla salI-katkaisukohtaan asti ja geenin toinen puolisko valmistettiin kuudesta oligonukleotidista EG-9 - EG-14 SalI-katkaisukohdasta BamHI-katkaisukohtaan asti. Rakennettaessa EqIFN- γ :an muoto, joka oli lyhennetty aminopäässä kolmen aminohapon verran, käytettiin oligonukleotidien EG-1 ja EG-2 asemesta oligonukleotideja EG-15 ja EG-16.

15 Keksinnön kohteena eivät ole ainoastaan geeni-sekvenssit, jotka koodaavat spesifisesti keksinnön mukaisia interferoneja, vaan myös modifikaatiot, jotka voidaan saada helposti ja rutiininomaisesti mutatoimalla, hajottamalla, transposoimalla tai addition avulla. Keksintö kattaa myös jokaisen sekvenssin, joka koodaa keksinnön mukaisia interferoneja (so. jolla on tässä
20 yhteydessä kuvattu biologinen aktiivisuusspektri) ja joka on annettuihin sekvensseihin verrattuna degeneroitu; alan ammattihenkilöt kykenevät degeneroimaan koodaavien alueiden DNA-sekvenssejä. Keksintöön sisältyy myös jokainen sekvenssi, joka koodaa polypeptidiä, jolla on keksinnön mukaisten interferonien
25 aktiivisuusspektri ja joka hybridisoituu annettujen sekvenssien (tai niiden osien) kanssa tringenteissä olosuhteissa (esim. olosuhteissa, jotka selektoivat yli 85%:n, mieluummin yli 90%:n homologian).

30 Hybridisoinnit suoritetaan 6xSSC/5x Denhardtin liuos/0,1% SDS-seoksessa 65°C:ssa. Stringenttiysaste määrätään pesuvaiheessa. DNA-sekvenssien, joiden homologia on noin 85% tai enemmän, selektoimiseen sopivat olosuhteet ovat siten 0,2xSSC/0,01% SDS/65°C ja DNA-sekvenssien, joiden homologia on noin 90% tai
35 enemmän, selektoimiseen sopivat olosuhteet ovat 0,1xSSC/0,01% SDS/65°C.

Keksinnön mukaisia interferoni-geenejä voidaan laittaa jokaiseen organismiin olosuhteissa, joissa saadaan korkeita saantoja. Sopivat isännät ja vektorit ovat alan ammattimiehen parhaiten tuntemia; esimerkkien suhteen viitattakoon patenttijulkaisuun EP-A-0.093.619.

Ekspressoointiin käytetään parhaiten prokaryootteja, esimerkiksi E.coli K 12 kantaa 294 (ATCC No. 31 446) tai E.coli X1776 kantaa (ATCC No. 31.537). Edellä mainittujen kantojen kaltaisesti voidaan käyttää myös E.coli W 3110 (F-, Lambda-, prototroofi, ATCC No. 27325) kantaa, basilleja kuten Bacillus subtilis -bakteeria ja muita Enterobacteriaceae-bakteereita kuten Salmonella typhimurium tai Serratia marcescens -bakteereita ja erilaisia pseudomonades-bakteereita.

15

Näiden isäntien kanssa voidaan yleisesti sanoen käyttää plasmidi-vektoreita, jotka sisältävät isäntäsolujen kanssa yhteensopivista lajeista peräisin olevia kontrollisekvenssejä. Vektorissa on tavallisesti replikaatiokohdan lisäksi tunnistamissekvenssiä, jotka mahdollistavat transformoitujen solujen selektoinnin fenotyypin perusteella. Esimerkiksi E.coli transformoidaan tavallisesti pBR322:lla, so. E.coli-lajeista peräisin olevalla plasmidilla (Bolivar, et al., Gene 2, 95 (1977)). pBR322 sisältää geenin ampicilliini- ja tetrasykliiniresistenttitydelle, mikä antaa mahdollisuuden identifioida transformoidut solut. pBR322-plasmidin tai myös muiden plasmidien on lisäksi sisällettävä promoottoreita tai ne on varustettava promoottoreilla, joita mikrobiorganismi voi käyttää omien proteiiniensa ekspressoointiin. Rekombinantti-DNA:n valmistamisessa useimmiten käytettyihin promoottoreihin kuuluvat β -laktamaasi-(penisilinaasi) ja laktoosipromoottori-systeemit (Chang et al., Nature 275, 615 (1978); Itakura et al., Science 198, 1+056 (1977); Goeddel et al., Nature 281, 544 (1979)) ja tryptofaani(trp)-promoottorisysteemit (Goeddel et al., Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980); EP-A-0.036.776). Näiden erityisen käyttökelpoisten promoottorien lisäksi on myös kehitetty ja käytetty muita mik-

robipromoottoreita. Keksinnön mukaisten interferonien geenisekvenssi voidaan laittaa esimerkiksi bakteerifaagin Lambda (P_L) Leftward-promoottorin kontrollin alaiseksi. Tämä promoottori on erityisen tehokas, ohjattavissa oleva promoottori. Ohjauksen mahdollistaa Lambda-repressori, josta tunnetaan vierekkäiset restriktiokatkaisukohdat. Tämän repressori-geenin lämpötila-herkkä alleeli voidaan liittää vektoriin, joka sisältää EqIFN- γ -sekvenssin. Jos lämpötila kohotetaan 42°C:een, repressori inaktivoituu ja promoottori aktivoituu. Tätä systeemiä käyttämällä on mahdollista muodostaa kloonipankki, jossa funktionaalinen IFN-sekvenssi sijaitsee ribosomin sitoutumiskohdan läheisyydellä eri etäisyyksillä Lambda- P_L -promoottorista. Nämä kloonit voidaan tämän jälkeen tutkia ja selektoida niistä korkeimman saannon omaavat.

15

Keksinnön mukaisia proteiineja koodaavan sekvenssin ekspressio ja translaatio voi myös tapahtua muiden säätelysysteemien kontrollin alaisena, joita voidaan pitää "homologisina" organismin kanssa sen transformoimattomassa muodossa. Siten sisältää esimerkiksi laktoosista riippuvan E.colin kromosomaalinen DNA laktoosi- tai lak-operonin, joka mahdollistaa laktoosin hajottamisen erittämällä β -galaktositaasi-entsyymiä.

Lak-kontrollielementit voidaan saada myös bakteerifaagista Lambda-plac5, joka infektoi E.coli-bakteeria. Faagin lak-operoni voidaan saada transduktoimalla samoista bakteerilajeista.

Säätelysysteemejä, joita voidaan käyttää keksinnön mukaisessa menetelmässä, voidaan myös saada plasmidi-DNA:sta, joka on organismille ominainen. Lak-promoottori-operaattori-systeemi voidaan indusoida IPTG:lla.

Yhtä hyvin voidaan käyttää muitakin promoottori-operaattori-systeemejä tai niiden osia: esimerkiksi arabinoosi-operaattori, kolisiini E_1 -operaattori, galaktoosi-operaattori, alkalinen

fosfataasi-operaattori, trp-operaattori, ksyloosi-A-operaattori, tac-promoottori jne.

Prokaryoottien lisäksi voidaan käyttää myös eukaryoottisia mikro-organismeja kuten hiivaviljelmiä. *Saccharomyces cerevisiae* on eukaryoottisista mikro-organismeista yleisimmin käytetty, vaikkakin saatavissa on joukko muitakin lajeja. *Saccharomyces*-hiivassa ekspressoointiin käytetään esimerkiksi plasmidia YRp7 (Stinchcomb et al. *Natur* 282, 39 (1979); Kingman et al., *Gene* 7, 141 (1979); Tschumper et al., *Gene* 10, 157 (1980)) ja plasmidia YEp13 (Bwach et al., *Gene* 8, 121-133 (1979)). Plasmidi YRp7 sisältää TRP1-geenin, joka tekee mahdolliseksi leimata selektointia varten hiivamutantin, joka ei kykene kasvamaan tryptofaanittomassa alustassa, esimerkiksi ATCC No. 44076.

TRP1-vaurion läsnäoloa hiivaisännän genominn tunnusmerkkinä voidaan tällöin käyttää tehokkaana apukeinona transformaation osoittamisessa, kun viljellään ilman tryptofaania. Aivan vastaavalla tavalla käyttäytyy plasmidi YEp13, joka sisältää hiivageenin LEU 2, jota voidaan käyttää LEU-2-miinus-mutantin täydentämiseen. Hiivavektoreille sopiviin promoottori-sekvensseihin kuuluvat seuraavien geenien 5'-viereinen alue: ADH I (Ammere G., *Methods of Enzymology* 101, 192-201 (1983)).

25

3-fosfoglyseraatti-kinaasi (Hitzeman et al., *J. Biol. Chem.* 255, 2073 (1980)) ja muut glykolyttiset entsyymit (Kawasaki ja Fraenkel, *BBRC* 108, 1107-1112 (1982)) kuten enolaasi, glyseriinaldehydi-3-fosfaatti-dehydrogenaasi, heksokinaasi, pyruvaatti-dekarboksylaasi, fosfofruktokinaasi, glukoosi-6-fosfaatti-isomeraasi, fosfoglukooosi-isomeraasi ja glukokinaasi. Sopivien ekspressioplasmidiin rakentamisessa voidaan käyttää näihin geeneihin liittyviä terminaatiosekvenssejä myös ekspressiovektorissa ekspressoitavan sekvenssin 3'-päässä mahdollistamaan mRNA:n polyadenylaatio ja terminaation.

35

Muita promoottoreita, joilla lisäksi on etuna kasvuolosuhteiden kontrolloima transkriptio, ovat seuraavien geenien promoottori-alueet: alkoholi-dehydrogenaasi-2-, isosytokromi C, hapan fosfataasi, hajottavat entsyymit, jotka ovat kytkeytyneet typpi-

5 metaboliaan, edellä mainittu glyseriini-aldehydi-3-fosfaatti-dehydrogenaasi ja entsyymit, jotka vastaavat maltoosin ja galaktoosin käytöstä. Lämpötilaltaan säädellyissä systeemeissä voidaan käyttämällä lämpötilasta riippuvia sir mutaatioita käyttää promoottoreita, joita säätelevät hiivan Mating-tyyppi-

10 nen locus, esimerkiksi geenien BARI, MF α 1, STE2, STE3, STE5, promoottoreita, (Rhine Ph.D. Thesis, University of Oregon, Eugene, Oregon (1979), Herskowitz ja Oshima, The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces, part I, 181-209 (1981). Gold Spring Harbor Laboratory). Nämä mutaatiot vaikuttavat hiivojen

15 lepäävien Mating-tyyppisten kasettien ekspressioon ja siten epäsuorasti Mating-tyypistä riippuviin promoottoreihin. Yleisesti sopii kuitenkin jokainen plasmidivektori, joka sisältää hiivan kanssa yhteen sopivan promoottorin, originääriset replikaatio- ja terminaatiosekvenssit.

20 Mikro-organismien lisäksi sopivia isäntäorganismeja ovat myös monisoluisien organismien viljelmät. Periaatteessa voidaan käyttää jokaista tällaista viljelmää riippumatta onko se selkärangaisen tai selkärangattoman eläimen viljelmästä. Suurin mielenkiinto kohdistuu kuitenkin selkärankaisten soluihin, ja si-

25 ten selkärankaisten solujen kasvattaminen viljelmässä (kudosviljelmä) on viime vuosina johtanut rutiinimaiseen menetelmään (Tissue Culture, Academic Press, Kruse ja Patterson, toim. (1973)). Tällaisista hyödyllisistä isäntäsolulinjoista ovat

30 esimerkkejä VERO- ja HeLa-solut, CHO-solut ja WI38, BHK, COS-7 ja MDCK-solulinjat. Näille soluille tarkoitettut ekspressiovektorit sisältävät tavallisesti (tarvittaessa) replikaation aloituskohdan, promoottorin, joka sijaitsee ekspressoitavan geenin edellä yhdessä kaikkien tarvittavien ribosomien sitoutumiskoh-

35 tien kanssa. RNA-katkaisukohdat, polyadenylaatiokohdat ja transkriptionaaliset terminaatiosekvenssit.

- Nisäkässoluissa käytettäessä ovat ekspressiovektoreiden kontrollifunktiot useimmiten peräisin virusmateriaalista. Tavallisesti käytetyt promoottorit ovat esimerkiksi peräisin Polyoma
- 5 Adenovirus 2:sta ja erityisen usein SV 40 -viruksesta (Simian Virus 40). SV 40 -viruksen varhaiset ja myöhäiset päätepromoottorit ovat erityisen hyödyllisiä, koska kummatkin on helposti saatavissa viruksesta fragmenttina, joka sisältää vielä myös SV 40 -viruksen viraalisen replikaatiokohdan. (Fiers et al.,
- 10 Nature 273, 113 (1978)). Myös SV 40 -viruksen pienempiä tai suurempia fragmentteja voidaan käyttää, edellyttäen, että ne sisältävät lähes 250 bp pitkän sekvenssin, joka ulottuu HindIII-katkaisukohdasta viraalisen replikaation aloituskohdan BglI-katkaisukohtaan asti. Lisäksi on myös mahdollista ja usein
- 15 suositeltavaa käyttää promoottori- tai kontrolli-sekvenssejä, jotka ovat normaalisti liittyneet haluttuihin geenisekvensseihin, edellyttäen että nämä kontrollisekvenssit sopivat yhteen isäntäsolusysteemien kanssa.
- 20 Replikaation aloituskohta voi olla joko varustettu vastaavalla vektorirakenteella jotta voitaisiin rakentaa mukaan eksogeeninen aloituskohta, esimerkiksi SV 40 -viruksesta tai muista viruslähteistä (esim. Polyoma, Adeno, VSV, PBV, jne.) tai sen voi antaa isäntäsolujen kromosomaalinen replikaatiomekanismi. Jos
- 25 vektori integroidaan isäntäsolun kromosomiin, viimeksi mainittu toimenpide on useimmiten riittävä.
- Parhaiten voidaan keksinnön mukaiset DNA-sekvenssit ekspressoیدا myös ekspressioplasmidissa pER103 (E. Rastl-Dworkin et al.,
- 30 Gene 21, 237-248 (1983) ja EP-A-0.115.613 - tallennettu DMS-kokoelmaan numerolle DSM 2773 20.12.1983) plasmidissa parpER33 (EP-A-0.115.613) tai plasmidissa pRH100, sillä nämä vektorit sisältävät kaikki säätelyelementit, jotka saavat aikaan kloona-
- 35 käytetään synteettisen EqIFN-γ-geenin ekspressiovektorina plasmidia pRH100, joka sisältää säädeltävän tryptofaanipromoottorin

Serratia marcescens -bakteerista ja keinotekoisien ribosomien sitoutumiskohdan. Ekspressioplasmidin pRH100 valmistamista varten linearisoitiin plasmidi pER103 (Eva Dworkin-Rastl et al., Gene 21 (1983) 237-248, EP-A-0.115.613) restriktioendonukleaa-

5 silla HindIII ja 5'-terminaaliset fosfaattiryhmät poistettiin.

Tämä plasmidi-DNA sekoitettiin ja ligitoitiin fosforyloitujen oligonukleotidien d(AGCTTAAAGATGAGCT) ja d(CATCTTTA) kanssa. Ligaasireaktio suoritettiin pilkkomalla restriktioendonukleaa-

10 leaasilla SacI ja ligatoitiin lisäämällä T4-PNK:ia. Oligonukleotidit valmistettiin analogisesti patenttijulkaisussa EP-A-0.115.613 kuvatus menetelmän kanssa. Tämän ligaasireaktion tuote lisättiin kompetentteihin E.coli HB101-soluihin ja inkuboitiin. Muodostuneista bakteeripesäkkeistä valittiin mielivaltaisesti 12 ja näistä eristettiin plasmidit mikromitassa (Birnboim ja Doly, Nucl. Acids Res. 7 (1979) 1513-1523). Saatu DNA pil-

15 kottiin restriktioendonukleaaasilla SacI ja DNA erotettiin agarosigeelillä (1%, 1x TBE-puskuri). DNA:n kulkeutuminen lineaarisena, noin 4400 bp suuruisena molekyylinä vahvasti SacI-tunnistamiskohdan liittymisen plasmidiin. Yksi tällainen plasmidi valittiin mielivaltaisesti. E.coli HB101 transformoitiin vielä kerran DNA:lla, joka oli saatu tähän kuuluvasta minivalmistuksesta. Saaduista transformoiduista bakteereista valittiin yksi pesäke ja tätä kasvatettiin suuremmassa mitassa. Tästä eristetty plasmidi pilkottiin restriktioendonukleaseilla EcoRI ja

20 BamHI, DNA erotettiin 1-prosenttisellä agarosigeelillä ja pienempi fragmentti eristettiin geelistä elektroeluoimalla. Tämä noin 460 bp pitkä EcoRI-BamHI-DNA-fragmentti sekvensoitiin Sangerin menetelmällä (F. Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci.

25 (1977) 5463-5467). Tällä tavoin analysoidulle plasmidille annettiin nimeksi pRH100.

Plasmidi pilkottiin SacI-entsyymillä ja ylipitkät DNA-päät ta-

30 soitetettiin käsittelemällä Klenowin fragmentilla (Amersham) kaikkien neljän dosoksinukleotiditrifosfaatin läsnäollessa. Reaktio pysäytettiin uuttamalla fenoli/kloroformilla ja DNA

väkevöitiin saostamalla etanolilla. Tämä käsittely tekee tryptofaanin promoottoriin liittyneenä tylpän DNA-pään, joka päättyy translaation aloituskodoniin "ATG". Tämän jälkeen pilkotaan linearisoitu plasmidi-DNA BamHI:lla ja eristetään vektoriosa.

5

Näin esivalmisteltu pRH100 plasmidi-vektori sekoitetaan ligatoitujen oligonukleotidien EG-1 - EG-8 ja EG-9 - EG-14 kanssa ja inkuboidaan ligatointipuskurissa T4 DNA-ligaasin kanssa.

Kompetentiksi tehty E.coli, parhaiten JM101, transformoidaan

10 tällä ligatointiseoksella ja inkuboidaan yön yli. Saaduista transformanteista eristetään minipreparointimenetelmällä plasmidi-DNA ja rakenne selvitetään restriktioanalysoimalla ja sekvensoimalla HindIII-BamHI-insertti. Plasmidille, jolla on haluttu rakenne valmiin EqIFN- γ :n ekspressoitua varten, annetaan nimeksi pEqG-YYC1. Täysin analogisella tavalla kloonataan pRH100-vektorin oligonukleotidit EG-15,16 EG-3 - EG-8 ja EG-9 - EG-14 jotta saataisiin kolmen aminohapon verran lyhennetty EqIFN- γ . Plasmidille, jolla on haluttu rakenne, annetaan nimeksi pEqG-QAA1.

20

Solut voidaan transformoida vehikkeleillä lukuisilla menetelmillä. Se voi tapahtua esimerkiksi kalsiumilla, jolloin joko solut pestään magnesiumissa ja DNA lisätään kalsiumiin suspendoituihin soluihin tai solut saatetaan alttiiksi DNA:n ja kalsiumfosfaatin ko-sakalle. Seuraavassa geeniekspressiossa siirretään solut alustoille, jotka selektoivat transformoidut solut.

25

Jotta voitaisiin osoittaa E.coli JM101 solujen, jotka sisältävät plasmidin pEqG-YYC1 tai pEqG-QAA1, ekspressoima interferoniaktiivisuus, bakteerit laitetaan inkuboinnin jälkeen sopivaan viljelyalustaan ja supernatantista määritetään steriilisuodatuksen jälkeen interferoniaktiivisuus menetelmässä, joka mittaa VSV:n tai EMCV:n sytopaattisen vaikutuksen (CPE). Tähän käytetään NBL-6 soluja (ATCC CCL 57, hevosennahan epidermisoluja), jotka oli infektoitu VSV:lla (Vesicular-Stomatitis-virus),

35

ja/tai A549-soluja (ATCC CLL185, ihmisen keuhkokarsinoma-solulinja), jotka oli infektoitu EMC:lla (Encaphalomyocarditis Virus).

- 5 Ekspressoidut hevosinterferonit osoitetaan leimaamalla proteiinit maksisoluisissa. Plasmidikoodatut proteiinit voidaan leimata selektiivisesti in vivo käyttämällä maksisolutekniikkaa (Sancar, A. Et al., J. Bacteriol, 137, 692-693 (1979). E.coli CSR603 kannalla (CGSC 5830) ei ole mitään mekanismeja, joilla
- 10 korjata UV-säteilyn aiheuttamat DNA-vauriot. Säteilyttäminen sopivalla UV-säteilyannoksella tuhoaa bakteerikromosin, kun taas sitä vastoin oleellisesti pienemmät ja useampina kopioina solua kohti läsnäolevat plasmidi-DAN:t jäävät toimintakykyisiksi. Sen jälkeen kun kaikki vaurioitumattomat, lisääntyvät solut
- 15 on tapettu D-sykloseriini-antibiootilla ja endogeeninen mRNA on hajotettu, transkriptoidaan ja translatoidaan jäljelle jääneissä soluissa vain yhä plasmidissa koodatut geenit. Muodostuneet proteiinit voidaan leimata radioaktiivisesti ja osoittaa liittämällä mukaan ³⁵S-metioniinia. E.coli CSR603 transformoidaan
- 20 tavanomaisilla menetelmillä ekspressioplasmideilla ja transformoidut bakteerit selektoidaan ambisilliinipitoisella agar-maljoilla. Maksisolujen valmistaminen ja proteiininen leimaaminen tapahtuu A. Sancarin ohjeiden mukaisesti. Molekyylipainon standardina käytetään ¹⁴C-metyloitua proteiiniseosta (Amersham).
- 25 Kontrolleina käytetään pER103-plasmidia, joka sisältää vain promoottorin ilman interferonigeeniä, ja pER21/1-plasmidia, joka sisältää kaksi kopiota humaanista IFN- α 2arg-geeniä.

Tunnetut biologiset ja immunologiset määritykset sopivat keksinnön mukaisten tuotteiden karakterisoimiseen. Koska sekä α -, β - että γ -interferoneille on ominaista PFU- ja CPE-määrityksessä osoitettavissa oleva antiviraalinen ominaisuus, keksinnön mukaisen EqIFN- γ :n erottamiseen α -EqIFN:sta ja/tai β -EqIFN:sta käytetään hyödyksi interferonin erilaista antigeenisyyttä.

EqIFN- α :n ja/tai EqIFN- β :n vastaiset antiseerumit eivät neutra-
loi keksinnön mukaisia polypeptidejä. Toiseksi erotuskriteerik-
si sopii keksinnön mukaisten polypeptidien happolabiilisuus
sekä herkkyys natriumdodekyylisulfaatile (SDS). Sekä inkuboin-
5 ti 0,2%:sen SDS-liuoksen kanssa että polypeptidien inkubointi
pH-arvolla 2 muutaman tunnin ajan 4°C:ssa tuhoaa virusten vas-
taisen aktiivisuuden lähes täydellisesti. EqIFN- α ja EqIFN- β
ovat samoissa olosuhteissa stabiileja.

10 Hevosgenomin sekvenssien, joilla on korkea homologia interfe-
ronigeenin kanssa, kokonaisluvun osoittamista varten pilkotaan
suurimolekyylinen hevos-DNA täydellisesti vastaavilla restriktio-
entsyymeillä ja nämä pilkotut DNA:t erotetaan koon perus-
teella. Nitroselluloosasuodattimille suoritettun Southern-siir-
15 ron, denaturoinnin ja DNA:n kiinnittämisen jälkeen jokainen
suodatin hybridisoidaan nik-translatoimattomien koettimien
kanssa. Koettimena EqIFN- γ :lle käytetään plasmidista pEqG-YYC1
saatua fragmenttia, joka sisältää koodaavan sekvenssin koko
valmiille interferonille. Tämän jälkeen suodattimet pestään
20 stringenteissa olosuhteissa. Autoradiografia tapahtuu DuPont
Cronex röntgenfilmillä käyttämällä Kodak Lanex-Regular vahvis-
tuskalvoja 7 päivää -80°C:ssa.

Isännän suoritettun transformoinnin, geenin ekspression ja solu-
25 jen viljelyn olosuhteissa, joissa keksinnön mukainen proteiini
ekspressoituu, jälkeen voidaan tuote erottaa tavalliseen tapaan
tunnetuilla kromatografisilla erotusmenetelmillä, jolloin saa-
daan materiaalia, joka sisältää proteiineja, joissa on tai ei
ole Leader- ja Tailing-sekvenssit. Keksinnön mukaiset interfe-
30 ronit voidaan ekspressoida niin, että N-päässä on Leader-sek-
venssi (Pre-IFN), joka interferonit eräät isäntäsolut voivat
poistaa. Jos näin ei ole, Leader-polypeptidi (kun se on läsnä)
on siten, lohkaistava pois jotta saataisiin valmista interfero-
nia. IFN-klooni voidaan vaihtoehtoisesti modifioida niin, että
35 valmis proteiini muodostuu mikro-organismissa suoraan Pre-IFN:n
asemesta. Tätä tapausta varten voidaan käyttää hiivan Mating-

feromonin prekursori-sekvenssiä MF- α -1 jotta taattaisiin fuusioidun proteiinin oikea "kypsyys" ja tuotteiden erottuminen kasvatusalustaan tai periplasmiseen tilaan. Funktionaalisen tai valmiin IFN:n DNA-sekvenssi voi olla liitetty MF- α -1:n kanssa oletettuun katepsiinimäiseen katkaisukohtaan (Lys-Arg:in jälkeen) asemaan 256 aloituskodonista ATG lähtien (Kurjan, Herskowitz, Cell 30, 933-943 (1982)).

Seuraavassa yleiskaaviossa on kuvattu menetelmä, jolla EqIFN- γ voidaan puhdistaa esimerkiksi bakteereista.

1. Solut uutetaan johtokyvyltään suuressa lyysauspuskurissa (noin pH 8) johtamalla homogenisaattorin läpi korkeassa paineessa; poistovirta jäähdytetään jäähauteessa.

2. DNA saostetaan lisäämällä polyetyleni-iminiä samalla sekoittaen, esimerkiksi 4°C:ssa.

3. Bakteeriproteiinit saostetaan pH:n avulla, jolloin EqIFN- γ jää jälleen liuokseen.

4. Kiintoaines erotetaan sentrifugoimalla 4°C:ssa.

5. Supernatantti väkevöidään (pH-arvon uudelleen säädön jälkeen) esimerkiksi ultrasuodattamalla.

6. Konsentraatti dialysoidaan johtokyvyltään alhaista puskuria vasten.

7. Kiintoaines erotetaan sentrifugoimalla, jolloin EqIFN- γ jää liuokseen.

8. Ioninvaihtokromatografoidaan karboksymetyyliselluloosalla eluoimalla gradientilla, jonka ionivahvuus kasvaa.

9. Kromatografoidaan kalsiumfosfaatti-geelillä ja eluoidaan gradientilla, jonka ionivahvuus kasvaa.

10. Ioninvaihtokromatografoidaan karboksimeetyyliselluloosalla
5 heikosti denaturoivissa olosuhteissa ja eluoidaan gradientilla, jonka ionivahvuus kasvaa.

11. Erotetaan geelisuodatuskromatografian avulla.

10 Mainitulla menetelmällä on mahdollista päästä puhtaudeltaan yli 95%:n materiaalisointoihin.

Tässä kohdassa mainittakoon, että keksinnön mukaisissa interferoneissa ei ole kysymys vain interferoneista, jotka on kuvattu yksitellen, vaan myös näiden polypeptidien jokaisesta modifi-
15 kaatiosta, joka ei oleellisesti muuta hevos- γ -IFN-aktiivisuutta. Näihin modifikaatioihin sisältyvät esimerkiksi molekyylin lyhentäminen, esimerkiksi N- tai C-terminaalisisä päässä, aminohappojen vaihtaminen muihin ryhmiin, molekyylin kemialli-
20 set ja biokemialliset sitomiset muihin molekyyliin, jotka ovat inerttejä tai aktiivisia. Viimeksi mainituissa modifikaatioissa voi olla kysymys esimerkiksi hybridimolekyyleistä, jotka muodostuvat yhdestä tai useammasta keksinnön mukaisesta interferonista ja/tai tunnetuista α - tai β -interferoneista.

25 Uusia, keksinnön mukaisia interferoneja voidaan käyttää biologiseen vaikutuskirjoonsa perustuen kaikenlaatuiss hoidoissa, joihin myös tunnettuja interferoneja käytetään. Näihin kuuluvat esimerkiksi herpes, nuhavirus, Equine-Abortion-virus, erilaiset
30 syöpälajit ja vastaavat. Uusia interferoneja voidaan käyttää yksinään tai yhdistelmänä muiden tunnettujen interferonien tai biologisesti aktiivisten tuotteiden kanssa, esimerkiksi IFN-alfan, IL-2:n, muiden imuuni-modulaattoreiden ja vastaavien kanssa.

Keksinnön mukaisia interferoneja voidaan antaa parenteraalisesti tapauksissa, joissa tarvitaan tuumorien vastaista tai virusten vastaista hoitoa, ja tapauksessa, jossa esiintyy immunosuppressiivisia ominaisuuksia. Annostelu ja annostelumäärät voivat
 5 olla samanlaiset kuin mitä tällä hetkellä käytetään IFN-materiaalien klinisissä tutkimuksissa, esimerkiksi noin $(1-10) \times 10^6$ yksikköä päivässä, ja preparaateilla, joiden puhtaus on yli 1%, esimerkiksi 5×10^7 yksikköön asti päivässä.

- 10 Kun kyseessä on oleellisesti homogeeninen, bakteereiden avulla tuotettu keksinnön mukainen IFN, voidaan tarkoituksenmukaista annostelumuotoa varten parenteraalisessa käytössä esimerkiksi liuottaa 3 mg EqIFN- γ :aa 25 ml:aan 5%:sta eläinperäistä seerumialbumiinia, parhaiten hevos/koira-seerumialbumiinia. Tämä
 15 liuos viedään sen jälkeen bakteerisuodattimen läpi ja suodatettu liuos jaetaan aseptisesti sataan pulloon, joista kukin sisältää 6×10^6 yksikköä puhdasta, parenteraaliseen antamiseen sopivaa interferonia. Ennen käyttöä pulloja säilytetään parhaiten kylmässä (-20°C). Keksinnön mukaiset aineet voidaan formu-
 20 loida tunnetulla tavalla niin, että saadaan farmaseuttisesti käyttökelpoisia aineita. Tällöin keksinnön mukainen polypeptidi sekoitetaan farmaseuttisen, hyväksyttävän kantajan kanssa. Tavanomaisia kantajia ja niiden formulointia on kuvattu E.W. Martinin teoksessa Remington's Pharmaceutical Sciences, mihin
 25 erityisesti viitataan. Sopivia farmaseuttisia aineita, jotka sopivat tehokkaaseen käyttöön vastaanottajalla (potilaalla), saadaan sekoittamalla keksinnön mukaiset interferonit mitatun määrän kanssa kantajaa. Parhaiten käytetään parenteraalista applikointia.

- 30 Käsillä olevan keksinnön kohteena ovat edelleen monoklonaaliset vasta-aineet keksinnön mukaisia polypeptidejä vastaan, hybridomasolut, jotka tuottavat tällaisia vasta-aineita, ja näiden valmistusmenetelmät. Parhaiten pidetään hybridomasolulinjoja ja
 35 näiden erittämiä monoklonaalisia vasta-aineita, jotka reagoivat spesifisesti EqIFN- γ :n kanssa. Menetelmälle, jolla tällaisia

monoklonaalisia vasta-aineita valmistetaan, on tunnusomaista, että pienet nisäkkäät, esimerkiksi kaniinit tai hiiret immunisoidaan keksinnön mukaisilla polypeptideillä, tällä tavoin immunisoitujen eläinten B-lymfosyytit fuusoidaan myeloomasolujen kanssa, muodostuneet hybridomasolut kloonataan, sen jälkeen viljellään in vitro tai injisoimalla hiiriin ja eristetään vasta-aineet viljelmistä.

Keksinnön kohteena ovat edelleen immuno-affiniteettikromatografia-pylväät ja immunomäärityksiin tarkoitettut testikitit, jotka sisältävät näitä vasta-aineita.

Keksinnön mukaisen menetelmän mukaisesti immunisoidaan hiiret, esimerkiksi Balb/c-hiiret, sinänsä tunnetuilla tavoilla. Eräissä hyvin pidetyssä suoritussuorituksessa injisoidaan keksinnön mukaisia polypeptidejä noin kerran viikossa tai myös pidemmin välein useamman viikon aikana, esimerkiksi 5 - 12 viikon aikana, kunnes vasta-ainetta tuottavia B-lymfosyyttejä on muodostunut riittävä määrä.

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

Immunisoitujen hiirten B-lymfosyyttejä sisältävät elimet, esimerkiksi pernasolut poistetaan ja fuusoidaan sellaisten myeloomasolujen kanssa, jotka mutaation vuoksi eivät kasva selektiivisessä viljelyalustassa. Tällaiset myeloomasolut ovat tunnettuja, ja näitä ovat esimerkiksi solut, joista käytetään nimityksiä X63-Ag8, X63-Ag8.6.5.3, MPC-11, NS1-Ag4/1, MOPC-21 NS/1 tai SP2/0. Eräässä hyvänä pidetyssä suoritussuorituksessa fuusoidaan immunisoitujen hiirten pernasoluja solulinjan X63-Ag8.6.5.3 myeloomasolujen kanssa. Fuusio suoritetaan sinänsä tunnetuilla menetelmillä sekoittamalla B-lymfosyyttejä ja myeloomasoluja samalla kun lisätään solujen fuusiointiaainetta kuten polyetyleeniglykolia, Sendai-viruksia, kalsiumkloridia tai lysolesitiiniä. Parhaiten fuusoidaan polyetyleeniglykolin, esimerkiksi polyetyleeniglykolin, jonka molekyylipaino on välillä 1000 ja 4000, läsnäollessa. Fuusion jälkeen viljellään muodostuneita hybridejä sinänsä tunnetulla menetelmällä selek-

tiivisessä viljelyalustassa, joka on täydennetty hypoksantii-
nilla, aminopteriinillä ja tymidiinillä (HAT-alusta). Fuusioi-
tumattomat myeloomasolut eivät kykene kasvamaan tässä alustassa
ja ne, kuten myös normaalit lymfosyytit kuolevat.

5

Hybridoma-viljelmien supernatanteista voidaan tutkia sinänsä
tunnetuilla menetelmillä niiden spesifisten vasta-aineiden pi-
toisuus, esimerkiksi radio-immunomäärityksen tai aglutinoinnin
avulla. Hybridomasolut, jotka tuottavat spesifisyydeltään halu-
10 tunlaisia vasta-aineita, erotetaan kloonaamalla fuusioinnin
muodostamasta mitä erilaisimpien hybridomasolujen seoksesta.
Tätä varten valmistetaan sinänsä tunnetulla menetelmällä, josta
käytetään nimitystä "limiting dilution", viljelmiä lähtemällä
yhdestä ainoasta kasvavasta solusta.

15

Massatuotantoa varten viljellään hybridoma-soluklooneja, jotka
tuottavat spesifisyydeltään halutunlaisia vasta-aineita, joko
sinänsä tunnetuissa alustoissa in vitro tai niitä injisoidaan
hiiriin niiden määrän lisäämiseksi. Eräässä hyvänä pidetyssä
20 suoritusmuodossa injisoidaan hybridomasoluja pristaanilla esi-
käsiteltyihin hiiriin, poistetaan Aszites-neste ja vasta-aineet
eristetään tästä saostamalla ammoniumsulfaattiliuoksella.

Näiden hybridomasolujen avulla saatuja spesifisiä vasta-aineita
25 voidaan käyttää sinänsä tunnetulla tavalla immunoaffiniteetti-
kromatografia-pylväiden valmistamiseen. Keksinnön eräässä hyvä-
nä pidetyssä suoritusmuodossa lisätään sopivaan kantajaan (joka
on suspendoitu puskuriliuokseen) vasta-aineliuosta, sitoutumat-
tomat osat pestään tämän jälkeen pois ja salvataan kantajamate-
30 riaalin vapaat paikat.

Vasta-aineita voidaan käyttää myös terapiassa.

Hybridomasolujen avulla saatuja spesifisiä vasta-aineita voi-
35 daan käyttää sinänsä tunnetulla tavalla testikittien valmista-
miseen. Nämä testikitit voivat perustua mitä erilaisimpiin me-

netelmiin, esimerkiksi radio-immunomääritykseen, lateksi-aglutaintointiin, täplä-testeihin, kompetetiiviseen tai Sandwich-radio-immunomääritykseen, entsyymi-immunomääritykseen, immuno-fluorososenssiin tai immunokemiallisiin entsyymitesteihin.

5

Eriteltynä keksinnön kohteena ovat:

polypeptidit oleellisesti puhtaassa muodossa

- joilla on hevos-interferoni- γ :n (EqIFN- γ) biologiset ja immunologiset ominaisuudet;

- 10 - jotka eivät oleellisesti sisällä muita eläinperäisiä proteiineja;

- joissa ei ole natiivia glykolysaatiota;

- joissa on metioniini-aminohappo ennen N-pään 1. aminohappoa;

- joilla on aminohapposekvenssi

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

20 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

...25 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

⋮ 30 110 115 120

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

35 Gln Asn Pro Phe Arg Gly Arg Arg Ala Leu Gln ***

tai

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
 5 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
 10 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 ***

DNA-molekyyli, jotka koodaavat:

- 15 - polypeptidiä, jolla on EqIFN- γ :n biologiset ja immunologiset ominaisuudet;
 - edellä annettua polypeptidiä;
 - valmista EqIFN- γ .

- 20 DNA-molekyyli, jotka
 - sisältävät täydellisen, luonnonmukaisen geenin EqINF- γ :lle;
 - nukleotidit

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

25 TTG GGT TCT TCT ACC TAT TAC TGC CAG GCC GCG TTT TTT AAA GAA

-----I N T R O N I 1-----

ATA GAA AAC CTA AAG GAA TAT TTT GTAAGTATGACCTTTTAATAATACTTAC

30 TTGTGGTTGAAATGACTGAACGTTGTCTTGGAGTTGGATCTCTGATAGGCTGTCCTCTCT

ACTCCACAGTCATCTTGAGAAGACTGGGTGTTATTTTCTCTGTTTGTGACTGGATGAGT

TTTTCTTTTTTTTACTAAATGATCTAGATATTGCTTTAACCCTCTGCTCAATTTGCTATA

GAGACTTAGAGAGGGTTCATGAATCTTCCAAAAGATGGGCTTAACAGGTTTATAAAGCAT

AGTGAAGTTGACAATTTTGTGGTGAGAAGCCACTGAATTGTGATAAGTCAAGTAGTGTGG

35 ACATTGAAAAAATGACTAGCTATTAGTTTCTAACTTCTCAGGTTACTATGATGGTGACAA

TAAAAGGTCAAGATTAGCATTAAAATGGTAATCTGAAATAATTGATCAGTTAAAGAAGGC

GCTGTCCTGAAAGGTTTGGCTGAAAAAAATCACTTTCAGGTGTTTTCTCCAAAAAATG
ATTTTAAAATCTTACTGCCCCGTTTGTGTTAGCTGTGAAGTACTCTGGAACCTCAGTCAAT
TGCTGAGATTTTGTACGAGTTATAAGCTGGCTTATATTTAAAAAATTTTTTGTTTTTGT
TTTATGAGTTTCTTTTAAAATGTTATTTATGGTTAATTAAAATAGTTTTTGCATTTTAAA
5 TATTTTATTATTGTCCAAAATTTAGCTATTTTAATTATAGTTGGAGCTCTCTTTTAGAG
CTGACATAAGACCATAGGGGAGGCACAGATAGATGTGATGGAGCCCTGTACCAGACGGGG
GCAGTATCTTATAGTGGGTTCCTTTGCTGATCTTTTTACTAGACTTGAAATTATTTGCT
TTTCCTTCCTATGGTTATTTGGGACTATTGAAGTATCACCAGCCCTGTTGAGTTCATCTG
TAATATTGTAATTCAAGGGTTACACTAGAAAATAAGAAAGCTAAACAGCAGGATAATCT
10 TTGGCTACATCCAACACAATAGCTTTTGGGAATACTTATTGTTAGAACTAAACAGAGGGT
TGAAAAGAAAATCAGTGAATACTGTCAGCATCTGAGTTCAATAAAACGTGAAGTACATTT

TTAGGGCAATTCATGGACTAATTGTAAACCAAGTTTTCCTTCCTTTTTTCAG AAC GDA

15 AGA AAC CCA GAT GTA GGG GAT GGT GGG CCT CTT TTC CTG GAT ATC

-----I N T R O N I 2-

TTG AAG AAC TGG AAA GAG GTAAGCTAAGTATTTCCATTTGGTTGATTTTCCTGT

20 TGCTTATTTTCTGGTGGATGAATTCACACCAACCTCTCTTTGTGCTCTTTTCTCCCTAG

GAT AGT GAC AAA AAA ATA ATT CAG AGC CAA ATC GTC TCC TTC TAC

TTC AAA CTC TTT GAA AAC TTG AAA GAT AAC CAG GTC ATT CAA AAG

25 AGC ATG GAC ACC ATC AAG GAG GAC CTG TTC GTT AAG TTC TTT AAC

AGC AGC ACC AGC AAG CTG GAA GAC TTC CAA AAG CTG AAT CAG ATT

30 -----I N T R O N I 3-----

CCG GTGAGGAGATCTTAATTCTTTCTTTGGTTTCATTACAGAGGTTCTTGCAAAGTGCT

TACGTCCCAGAAAGTAGAAATGAACTATGAAATGAACCCGTGGCCAAAACCTCCTCCTTCC

TAATTCATTTGTGCTTTGAGAGACTTTGCTAAGTCAGTATGGGAATCATTTAAATTTGT

GATTTGGGGAAATGCTGGCACTATGACTACTGCACAAAGGCAGGTGAAGGGACAAATCCA

35 GTGAGGAGGGGGCAGTGAAGAAGTGGAGGGGAGTCTGGAGAAGCAGGTCTCTCCTTGCCC

CTTGTTTCGTGAGATGAAATCCTCCTGCTTTGGATGGGAGGCTGCGTGTCTTGGTGGAAAG

AGCAGTGGGAGGAGGGAGAAGATTTGTGCTCCTCCCAGCTCAGCCACCAAGAACTGTGA
CCTCAGATGAATCACAGGCCTGGCTGGGGCTCAGTTTCCTCATCTTAAAAGAGGCCTATT
GGGTTCACTAAAATTTCTATGATCTTCTTTGCTCTATAATCCTACAATTCTGTGGACAGA
AAATGAAATGAGGTAGGAGAAAGAAATAGCCTTTGAAGAGGTTCTTGGGCATTCCACTGC
5 CAGGCTCTGGTCAACCTTCATACTCTGCAGCCCAAGAAGAGGCAAGACCATTTGTCTGTT
TTTGAAATGCAAATAGGCGGCATTTATACCTCACGAAAGAACTGTTCTGTCAACTTTTG
GATACTGGGCTATCTTGGCTGGAGAAATCCTTAGGCTCCCAAACCTTTCTCTCATGAAATT
GTCTTGAGTCTTTAAATTTATGGCTTCTCGAAGCTGAGAGATAACTTTAAGCATAAAGAC
AAATTACATTTTCCAACATTTTGTCTAAGAGACAAAGACCTCCACATGCCTTTGGGTTTG
10 GCCTGGATCTAAATGGGCTTGAATGAGAAGGGGAGGGTGTTGTTATGACTATGTTTAGAA
GAGAAAACAGAGGTTTGGAGAGGTTAAGTGGCTGGTTCAAAGTCAGAGTTATTGCACACA
CAGGATTCTGAACCCATATGTTTTGTCCCTCCACTTTAGGGTTCTTTTCGCTACATAATTT
TGAGAATTCTGTACCAGTCAATTTAAGGATGTGTGATGTTCCCCATCCTATTACAGCACA
ACCAGCAATTTAATTATAATTTTAGTCTTAACTGCTGAAGAAAGCAGCATTACATATTAA
15 GCTAACATATTCTTGGTGAAAGCAACTTTTTCAAAGGAATATTTCTATTTTCATGGACCA
TGACAGTAGCACAGCCTGATGGCTTGTATGCCTGAAACTAATTTTGCTGTTTTCTTTCCC

AATAG GTA AAT GAT CTG AAG GTC CAG CGC AAA GCA ATA AGT GAA CTC

```

:::
:::
:::20  ATC AAA GTG ATG AAT GAT CTG TCG CCC AAA GCT AAC CTG AGG AAG

```

CGG AAG AGG AGT CAG AAT CCA TTT CGA GGC CGG AGA GCG TTG CAA

25 TAG

tai

TAT TAC TGC CAG GCC GCG TTT TTT AAA GAA

-----I N T R O N I 1-----

```

:   ATA GAA AAC CTA AAG GAA TAT TTT GTAAGTATGACCTTTTAATAACTACTTAC
:   TTGTGGTTGAAATGACTGAACGTTGTCTTGAGTTGGATCTCTGATAGGCTGTCCTCTCT
   ACTCCACAGTCATCTTGAGAAGACTGGGTGTTATTTTCTCTGTTTGTTGACTGGATGAGT
   TTTTCTTTTTTTTACTAAATGATCTAGATATTGCTTTAACCCTCTGCTCAATTTGCTATA
35  GAGACTTAGAGAGGGTTCATGAATCTTCCAAAAGATGGGCTTAACAGGTTTATAAAGCAT
   AGTGAAGTTGACAATTTTGTGGTGAGAAGCCACTGAATTGTGATAAGTCAAGTAGTGTGG

```

ACATTGAAAAAATGACTAGCTATTAGTTTCTAACTTCTCAGGTACTATGATGGTGACAA
TAAAAGGTCAAGATTAGCATTAAAATGGTAATCTGAAATAATTGATCAGTTAAAGAAGGC
GCTGTCCTGAAAGGTTTGGCTGAAAAAAATCACTTTCAGGTGTTTTCTCCAAAAAATG
ATTTTAAAATCTTACTGCCCCGTTTGTGTTAGCTGTGAAGTACTCTGGAACCTCAGTCAAT
5 TGCTGAGATTTTGTACGAGTTATAAGCTGGCTTATATTTAAAAAATTTTTTGTGTTTTGT
TTTATGAGTTTCTTTTAAAATGTTATTTATGGTTAATTAAAATAGTTTTTGCATTTTAAA
TATTTTATTATTTGTCCAAAATTTAGCTATTTTAATTATAGTTGGAGCTCTCTTTTAGAG
CTGACATAAGACCATAGGGGAGGCACAGATAGATGTGATGGAGCCCTGTACCAGACGGGG
GCAGTATCTTATAGTGGGTTGCCTTTGCTGATCTTTTTACTAGACTTCAAATTATTTGCT
10 TTTCTTCCTATGGTTATTTGGGACTATTGAAGTATCACCAGCCCTGTTGAGTTCATCTG
TAATATTGTAATCAAGGGTTACACTAGAAAATAAGAAAGCTAAAACAGCACGATAATCT
TTGGCTACATCCAACACAATAGCTTTTGGGAATACTTATTGTTAGAACTAAACAGAGGGT
TGAAAAGAAAATCAGTGAATACTGTCAGCATCTGAGTTCAATAAAACGTGAAGTACATTT

15 TTAGGGCAATTCATGGACTAATTGTAAACCAAGTTTTCTTCCTTTTTTCAG AAC GCA

AGA AAC CCA GAT GTA GGG GAT GGT GGG CCT CTT TTC CTG GAT ATC

-----I N T R O N I 2-

20 TTG AAG AAC TGG AAA GAG GTAAGCTAAGTATTTCCATTGGTTGATTTTCCTGT

TGCTTATTTTCTGGTGGATGAATTCACACCAACCTCTCTTTGTGCTCTTTTCTCCCTAG
GAT AGT GAC AAA AAA ATA ATT CAG AGC CAA ATC GTC TCC TTC TAC
25 TTC AAA CTC TTT GAA AAC TTG AAA GAT AAC CAG GTC ATT CAA AAG
AGC ATG GAC ACC ATC AAG GAG GAC CTG TTC GTT AAG TTC TTT AAC
30 AGC AGC ACC AGC AAG CTG GAA GAC TTC CAA AAG CTG ATT CAG ATT

-----I N T R O N I 3-----

CCG GTGAGGAGATCTTAATTCTTTCTTTGGTTTCATTACAGAGGTTCTTGCAAAGTGCT
TACGTCCCAGAAAGTAGAAATGAACTATGAAATGAACCCGTGGCCAAAACCTCCTTCC
35 TAATTCCATTTGTGCTTTGAGAGACTTTGCTAAGTCAGTATGGGAATCATTTAAATTTGT
GATTTGGGGAAATGCTGGCACTATGACTACTGCACAAAGGCAGGTGAAGGGACAAATCCA

GTGAGGAGGGGGCAGTGAAGAAGTGGAGGGGAGTCTGGAGAAGCAGGTCTCTCCTTGCCC
 CTTGTTTCGTGAGATGAAATCCTCCTGCTTTGGATGGGAGGCTGCGTGTCTTGGTGGAAAG
 AGCAGTGGGAGGAGGGGAGAAGATTTGTGCTCCTCCCAGCTCAGCCACCAAGAAACTGTGA
 CCTCAGATGAATCACAGGCCTGGCTGGGGCTCAGTTTCCTCATCTTAAAAGAGGCCTATT
 5 GGGTTCATAAAATTTCTATGATCTTCTTTGCTCTATAATCCTACAATTCTGTGGACAGA
 AAATGAAATGAGGTAGGAGAAAGAAATAGCCTTTGAAGAGGTTCTTGGGCATTCCACTGC
 CAGGCTCTGGTCAACCTTCATACTCTGCAGCCCAAGAAGAGGCAAGACCATTTGTCTGTT
 TTTGGAAATGCAAATAGGCGGCATTTATACCTCACGAAAGAACTGTTCTGTCAACTTTTG
 GATACTGGGCTATCTTGGCTGGAGAAATCCTTAGGCTCCCAAACCTTCTCTCATGAAATT
 10 GTCTTGAGTCTTTAAATTTATGGCTTCTCGAAGCTGAGAGATAACTTTAAGCATAAAGAC
 AAATTACATTTTCCAACATTTTGTCTAAGAGACAAAGACCTCCACATGCCTTTGGGTTTG
 GCCTGGATCTAAATGGGCTTGAATGAGAAGGGGAGGGTGTGTTATGACTATGTTTAGAA
 GAGAAAACAGAGGTTTGGAGAGGTTAAGTGGCTGGTTCAAAGTCAGAGTTATTGCACACA
 CAGGATTCGAACCCATATGTTTTGTCCCTCCACTTTAGGGTTCTTTTCGCTACATAATTT
 15 TGAGAATTCTGTACCAGTCAATTTAAGGATGTGTGATGTTCCCCATCCTATTACAGCACA
 ACCAGCAATTTAATTATAATTTTAGTCTTAACTGCTGAAGAAAGCAGCATTACATATTAA
 GCTAACATATTCCTGGTGAAAGCAACTTTTTCAAAGGAATATTTCTATTTTCATGGACCA
 TGACAGTAGCACAGCCTGATGGCTTGTATGCCTGAAACTAATTTTGCTGTTTTCTTTCCC

 20 AATAG GTA AAT GAT CTG AAG GTC CAG CGC AAA GCA ATA AGT GAA CTC

 ATC AAA GTG ATG AAT GAT CTG TCG CCC AAA GCT AAC CTG AGG AAG

 CGG AAG AGG AGT CAG AAT CCA TTT CGA GGC CGG AGA GCG TTG CAA
 25

 TAG

 tai
 30
 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 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
 5 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
 10 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

15

tai

20

25

30

35

-1 1 5 10 15
 ATG TAC TAC TGC CAG GCT GCT TTC TTT AAA GAA ATC GAA AAC CTG AAA
 20 25 30
 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 CTT ATG

5

-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							

30

35

- hybridisoituvat jonkin edellä mainitun DNA-molekyylin kanssa olosuhteissa, joissa homologia on yli 85%, parhaiten yli 90%, jolloin nämä DNA-molekyylit voivat olla alkuperältään luonnon-

mukaisia, synteettisiä tai puolisynteettisiä ja voivat olla lähisukuisia näiden DNA-molekyylien kanssa mutaatioiden, nukleotidi-substituoiden, nukleotidi-deleetioiden, nukleotidi-inserttien ja nukleotidien inversioiden kautta ja jotka koodaavat polypeptidejä, joilla on EqIFN- γ :n biologinen ja immunologinen aktiivisuus.

DNA-molekyylit:

jotka sisältävät nukleotidit

10

EG-1 5'-TACTACTGCC AGGCTGCTTT CTTTAAAGAA ATCGAAAACC TGAAAGAATA
CTTCAACGCT CG-3'

tai

15

EG-2 5'-TTGAAGTATT CTTTCAGGTT TTCGATTCTT TTAAGAAAG CAGCCTGGCA
GTAGTA-3'

tai

20

EG-3 5'-TAACCCAGAC GTTGGTGACG GTGGTCCGCT GTTCCTGGAC ATCCTGAAAA
ACTGGAAAGA AGACTCTG-3'

tai

25

EG-4 5'-TTCTTTCCAG TTTTTCAGGA TGTCCAGGAA CAGCGGACCA CCGTCACCAA
CGTCTGGGTT ACGAGCG-3'

tai

30

EG-5 5'-ACAAAAAGAT CATCCAGTCT CAGATCGTTT CTTTCTACTT CAAACTGTTC
GAAAACCTGA AAGACAACC-3'

tai

35

EG-6 5'-TTTCAGGTTT TCGAACAGTT TGAAGTAGAA AGAAACGATC TGAGACTGGA
TCATCTTTTT GTCAGAGTC-3'

EG-7 5'-AGGTTATCCA GAAATCGATG GACACTATCA AAGAAGATCT GTTCGTTAAA
5 TTCTTCAACT CG-3'

tai

EG-8 5'-TCGACGAGTT GAAGAATTTA ACGAACAGAT CTTCTTTGAT AGTGTCCATC
10 GATTTCTGGA TAACCTGGTT GTC-3'

tai

EG-9 5'-TCGACTTCTA AACTGGAAGA CTTCCAGAAA CTGATCCAGA TCCCAGTTAA
15 CGACCTGAAA-3'

tai

EG-10 5'-GCTGAACTTT CAGGTCGTTA ACTGGGATCT GGATCAGTTT CTGGAAGTCT
20 TCCAGTTTAG AAG-3'

tai

EG-11 5'-GTTTCAGCGTA AGGCTATCTC TGAAGTATGA ACGACCTGTC
25 TCCAAAAGCT AA-3'

tai

EG-12 5'-CGCAGGTTAG CTTTTGGAGA CAGGTCGTTC ATAACCTTGA TCAGTTCAGA
30 GATAGCCTTA C-3'

tai

EG-13 5'-CCTGCGTAAA CGTAAACGTT CTCAGAACCC ATTCCGTGGT CGTCGTGCTC
35 TTCAGTAAG-3'

tai

EG-14 5'-GATCCTTACT GAAGAGCACG ACGACCACGG AATGGGTTCT GAGAACGTTT
ACGTTTA-3'

5

tai

EG-15 5'-CAGGCTGCTT TCTTTAAAGA AATCGAAAAC CTGAAAGAAT ACTTCAACGC
TCG-3'

10

tai

EG-16 5'-TTGAAGTATT CTTTCAGGTT TTCGATTTCT TTAAAGAAAG CAGCCTG-3'

15 jotka koodaavat EqIFN- γ :n osa-alueita, ja näiden DAN-molekyyli-
en koodaamat polypeptidit;

- jotka hybridisoituvat jonkin edellä mainitun DNA-molekyylin
kanssa olosuhteissa, joissa homologia on yli 85%, parhaiten yli
90%, jolloin nämä DNA-molekyyli-
20 luonnonmukaisia, synteettisiä tai puolisynteettisiä ja lähisu-
kua näiden DNA-molekyylien kanssa mutaatioiden, nukleotidisubs-
tituutioiden, nukleotidi-deleetioiden, nukleotidi-insertioiden
ja nukleotidien inversioiden kautta ja koodata EqIFN- γ :n osa-
alueita, sekä näiden DNA-molekyylien koodaamat polypeptidit.

25

Rekombinantti-DNA-molekyyli-
30 plasmidit, jotka sisältävät:

- edellä mainittua polypeptidiä koodaavan insertin;
- edellä mainitun DNA-molekyylin;
- edellä mainitun DNA-molekyylin funktionaalisessa yhteydessä
ekspression kontrollisekvenssin kanssa niin, että se voi repli-
koitua mikro-organismeissa kuten prokaryooteissa, esimerkiksi
E.coli-bakteerissa, eukaryooteissa, esimerkiksi Saccharomyces
cerevisiae-hiivassa, ja nisäkässoluissa, esimerkiksi hevosso-
35 luissa;

- vähintään kaksi nimillä EG-1 - EG-16 merkittyä DNA-molekyyliä liitettynä toisiinsa mielivaltaisena yhdistelmänä funktionaalisessa yhteydessä ekspression kontrollisekvenssin kanssa niin, että nämä voivat replikoitua mikro-organismeissa kuten prokaryooteissa, esimerkiksi *E.coli*-bakteereissa, eukaryooteissa, esimerkiksi *Saccharomyces cerevisiae*-hiivassa ja nisäkässoluissa, esimerkiksi hevossoluissa.

Rekombinantti-DNA-molekyylit, kuten plasmidit pAH111, pRH281/5, pRH282/5, pGN1, pGN3, pGN20, pEqGE-QAA2 tai pEqG-QAA3.

Isäntäorganismit, jotka on transformoitu jollakin edellä mainitulla rekombinantti-DNA-molekyyllillä, esimerkiksi prokaryootit, parhaiten *E.coli*, erityisesti *E.coli* JM101 tai HB101, eukaryootit, esimerkiksi *Saccharomyces cerevisiae* tai nisäkässolulinjat, parhaiten hevossolulinjat.

Menetelmä valmistaa keksinnön mukaisia polypeptidejä, jolloin

20 a) sopivat isäntäorganismit, esimerkiksi edellä mainitut, transformoidaan geneettisillä informaatioilla, jotka koodaavat keksinnön mukaisia polypeptidejä, parhaiten edellä mainituilla rekombinantti-DNA-molekyyleillä,

25 b) ekspressoidaan informaatio, joka tuottaa keksinnön mukaiset polypeptidit isäntäorganismissa, ja

c) eristetään keksinnön mukaiset polypeptidit.

30 Polypeptidit, jotka voidaan valmistaa näillä menetelmillä.

Keksinnön mukaisten polypeptidien käyttö terapeuttisessa hoidossa ja/tai immunisoinnissa tai farmaseuttisten preparaattien valmistamiseksi.

Terapeutttiseen hoitoon, esimerkiksi hevosten hoitoon tarkoitettu aine, jolle on tunnusomaista, että se sisältää farmaseuttisesti inerttien kantajien lisäksi tehokkaan määrän keksinnön mukaista polypeptidiä.

5

Menetelmä valmistaa monoklonaalisia vasta-aineita keksinnön mukaisia polypeptidejä vastaan, tunnettu siitä, että isäntä-eläimet immunisoidaan polypeptidillä, näiden isäntäeläimien B-lymfosyytit fuusioidaan myeloomasolujen kanssa, alikloonataan
 10 monoklonaalisia vasta-aineita erittävät hybridi-solulinjat ja viljellään in vitro tai in vivo.

Hybridi-solulinjat, jotka erittävät monoklonaalista vasta-ainetta keksinnön mukaista polypeptidiä vastaan.

15

Monoklonaaliset vasta-aineet, jotka kokonaan tai osittain neutraloivat spesifisellä tavalla keksinnön mukaisten polypeptidien vaikutuksen tai jotka sitoutuvat spesifisesti johonkin mainittuun polypeptidiin.

20

Monoklonaalisten vasta-aineiden käyttö terapiassa ja/tai jonkin keksinnön mukaisen polypeptidin kvalitatiiviseen ja/tai kvantitatiiviseen määrittämiseen.

25

Edellä mainittujen monoklonaalisten vasta-aineiden käyttö jonkin keksinnön mukaisen polypeptidin puhdistamiseen.

30

Keksinnön mukaisten polypeptidien määrittämiseen tarkoitettu testikitti, joka sisältää edellä mainittuja monoklonaalisia vasta-aineita.

Kuvioiden selitykset:

35

Kuvio 1: Lambda Eq-γ2:sta saadun 4664 bp pitkän BamHI-fragmentin DNA-sekvenssi. Koodattu aminohapposekvenssi ja intronin asema on annettu. Negatiivisesti numeroidut

aminohapot viittaavat hydrofobiseen signaali-
 diin. Valmiin EqIFN- γ :n ainoa potentiaalinen N-glyko-
 lyytaatiokohta kohdassa 86-88 on alleviivattu. RNA-
 polymeraasin sitoutumiselle tärkeät sekvenssit CCATC
 ja TATAAAA ovat alleviivattuja, kuten myös kaksi sig-
 naalisekvenssiä mRNA:n polyadenylaatiolle (AATAAA).

Kuvio 2: Eri lajien γ -interferonien aminohapposekvenssien ver-
 tailu. Signaaliptidi on osoitettu eteen asetetun
 "S"-numeroidun aminohapon avulla. "Konsensus"-sek-
 venssi isoina kirjaimina tarkoittaa jokaista amino-
 happoa, joka on kaikissa γ -interferoneissa identti-
 nen, ja pieninä kirjaimina aminohappoja, joita esiin-
 tyy yli 75%:ssa γ -interferoneista.

Kuvio 3: Hevos- γ -interferoni-geenin kokonaissynteisiin käytet-
 tyjen oligonukleotidien kaaviollinen esitys. Yksit-
 täisten oligonukleotidien pituus sekä niiden nume-
 rointi on annettu. Restriktiokatkaisukohdat, joita on
 synteettisen geenin sisällä vain kerran, on numeroi-
 tu.

Kuvio 4: Luonnollisen geenin (eq) ja synteettisen geenin (syn)
 valmista EqIFN- γ :aa koodaavien sekvenssien vertailu,
 kun kyseessä on E.coli-bakteerissa optimoidun geenin
 ekspressio. Erilaiset emäkset on merkattu täydellä.

Kuvio 5: Taulukko valmista EqIFN- γ :aa varten käytetyille kodo-
 neille. Vasemmalla reunalla on annettu kodonin ensim-
 mäinen emäs, keskellä toinen emäs ja oikealla reunal-
 la kolmas emäs. Taulukossa on annettu käytettyjen
 kodonien lukumäärä kyseiselle aminohapolle luonnolli-
 sessa geenissä sekä suluissa synteettiselle geenille.

Kuvio 6: Ekspressioplasmidin pRH100 rakenne.

Kuvio 7: pGN20:n rakenne ja restriktiokartta.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksintöä yksityiskohtaisesti keksintöä rajoittamatta.

5

Materiaalit

Lähtöaineet saatiin osittain kaupallisesti ja osittain EMBL-laitoksesta. Heidelberg. E.coli JM101, pUC9 ja M13mp8 saatiin
10 Bethesda Research Laboratories -laboratoriosta, E.coli-kannat, joissa oli supressorifaktori sup F, esimerkiksi E.coli NM526, 538 ja 539 ja vektorit Lambda-EMBL3 tai 3A olivat peräisin EMBL-laitoksesta ja niitä on myös saatavissa Stehelin/Basel-yhtiöstä (Sveitsi).

15

1. Hevos-DNA:n eristäminen

Pakastettu kudoksesta, esimerkiksi hevosen maksa hienonnettiin nestemäisessä tyypessä hienojakoiseksi jauheeksi ja sitä inkuboi-
20 tiin 3 tuntia 55°C:ssa seoksessa: 0,5M EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5% SDS, 0,1 mg/ml proteinaasi K (20 ml/g kudosta). Proteiinit poistettiin saadusta viskoosista liuoksesta uuttamalla fenolilla ja uuttamalla kolme kertaa fenoli/kloroformi/isoamyylialkoholi-seoksella (25/24/1 til.), dialysoitiin
25 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 10 mM NaCl -seosta vasten ja DNA saostettiin kahdella tilavuudella etanolia. Kuivattiin täydellisesti tyhjiössä, minkä jälkeen DNA liuotettiin TE-puskuriin (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) 4°C:ssa ja sitä ja 1,273 g CsCl/ml-liuosta sentrifugoitiin 62 tuntia nopeudella 40.000
30 kierrosta minuutissa 20°C:ssa (Sorvall 50Ti-roottori). CsCl-kradientti poistettiin tipoittain, DNA-pitoiset jakeet dialysoitiin TE-puskuria vasten ja sen jälkeen DNA saostettiin kahdella tilavuudella etanolia, pestiin 70%:lla etanolilla, kuivattiin ja liuotettiin uudelleen TE-puskuriin (4°C).

35

Valmiissa DNA-preparaatissa ei ollut RNA:a ja se oli pidempi kuin 50 kb (määritettiin elektroforeesin avulla 0,45%:sella agarosigeelillä).

5 2. Hevos-DNA:n osittainen pilkkominen endonukleasilla ja fraktiointi koon perusteella

Kaksi kertaa 50 μ g hevos-DNA:a inkuboitiin 37°C:ssa 1,6 yksikön kanssa Sau3A-entsyymiä 450 μ l:ssa reaktiomediumia (10 mM
10 Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂ 1 mM ditiotreitoli). 15, 25 ja 40 minuutin kuluttua otettiin 150 μ l:n näytteet ja näihin lisättiin 15 mM EDTA:a. Reaktio pysäytettiin lämmittämällä 10 minuuttia 70°C:ssa. Lisättiin 0,3 M Na-asetaattia, pH 6,0, minkä jälkeen DNA sekoitettiin 2,5 tilavuudella etanolia. TE-
15 puskuriin uudelleenliuottamisen jälkeen DNA erotettiin koon perusteella elektroforeesikäsittelemällä yön yli jännitteellä noin 1V/cm 0,45%:lla agarosigeelillä TBE-puskurissa (10,8 g/l Tris, 5,5 g/l boorihappo, 0,93 g/l Na₂EDTA). Koemarkkereiden (EcoRI:lla ja HindIII:lla kaksoispilkottu ja HindIII:lla pil-
20 kottu Lambda-DNA) erotettiin leikkaamalla geelipala, jossa DNA:n pituus oli 10 - 23 kb, DNA elektroluoitiin geelistä dialyysiletkussa 3 tunnin aikana 300 V:lla (puskuri 0,1 x TBE), puhdistettiin käyttöohjeen mukaisesti Elutip-D-pylvässä (Schleicher und Schüll) ja tämän jälkeen saostettiin etanolilla.
25 la.

Hevos-DNA-fragmenttien itsestään liittymisen, mikä toisaalta voi johtaa hevos-DNA-sekvenssien keinotekoisiiin hybrideihin ja toisaalta liian suuriin ja siten ei enää Lambda-faageihin laitet-
30 tettävissä oleviin DNA-paloihin, estämiseksi kokofraktioidut hevos-DNA-palat defosforyloitiin.

Tätä varten DNA:a inkuboitiin 30 minuuttia 37°C:ssa 140 μ l:ssa reaktiomediumia (50 mM Tris-HCl pH 9,5, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM
35 Zn-asetatti, 1 mM spermiidiini) yhdessä 5 yksikön kanssa na-
dansuolifosfataasia. Lisättiin vielä 5 yksikköä entsyymiä ja

inkuboitiin 30 minuuttia. EDTA:a lisättiin 25 mM loppukonsent-
raatioon, minkä jälkeen DNA uutettiin kerran fenoli/klorofo-
mi/isoamyylialkoholi-seoksella (25/24/1 til.), 2 kertaa kloro-
formi/isoamyylialkoholi-seoksella (24/1 til.), ja kertaa die-
5 tyylieetterillä, saostettiin etanolilla, kuivattiin ja liuotet-
tiin 0,1 x TE-puskuriin.

3. Hevosgenomi-DNA-kirjaston rakentaminen

10 Defosforyloidut 10 - 23 kb hevos-DNA-fragmentit kloonattiin
Lambda-vektorissa, esimerkiksi vektoreissa Lambda-EMBL3 tai -3A
(Frischauf, A.M. et al. J. Mol. Biol., 170, 827-842 (1983),
jossa on G-A-T-C kohesiivit päät, poistamalla faagi-DNA:n si-
säinen BamHI-fragmentti.

15

Vektoria kasvatettiin E.coli-kannassa, jossa oli supressorifak-
tori sup F, esimerkiksi E.coli NM526, 538 tai 539 (Frischauf,
A.M. et al. J. Mol. Biol., 170, 827-842 (1983), LB-liemessä
(Miller; Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor
20 Lab. Cold Spring Harbor, New York) 5 mM MgSO₄:n kanssa, saos-
tettiin polyetyleeniglykolilla ja puhdistettiin CsCl-tiheys-
kradiantti-sentrifugoimalla kaksi kertaa (0,71 g CsCl/ml liuos-
ta, 40 tuntia nopeudella 45.000 kerrosta minuutissa, 20°C).
Dialysoitiin TE-puskuria vasten, minkä jälkeen proteiinit pois-
25 tettiin faagi-DNA:sta uuttamalla kaksi kertaa fenoli/klorofo-
mi/isoamyylialkoholi-seoksella (24/1 til.) ja väkevöitiin saos-
tamalla etanolilla.

30

EMBL3A-vektorin päätefragmentit saatiin pilkkomalla BamHI:lla
täydellisesti 50 µg faagi-DNA:a 2 tuntia 37°C:ssa 450 µl:ssa
fraktiomediumia (10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM di-
tiotretoli), pysäyttämällä reaktio 15 mM EDTA:lla 10 minuutin
aikana 70°C:ssa ja saostamalla DNA etanolilla.

Uudelleenliittymisen välttämiseksi keskifragmentti jälkipilkottiin EcoRI:lla ja eronnut oligonukleotidi poistettiin saostamalla isopropanolilla.

- 5 BamHI-pilkottua Lambda-DNA:a pilkottiin tätä varten täydellisesti EcoRI:lla 2 tunnin aikana 37°C:ssa seoksessa: 450 μ l 10 mM Tris-HCl pH 7,5 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, ja reaktio pysäytettiin lisäämällä 15 mM EDTA:a ja lämmittämällä 10 minuuttia 70°C:ssa. Na-asetaatia lisättiin 0,3 M loppukonsentraatioon asti, minkä jälkeen 3 suurta DNA-fractiontia saostettiin 0,6 tilavuuksilla isopropanolia 15 minuutin ajan 0°C:ssa, pestiin 2 kertaa 0,45 M Na-asetatti/0,6 til. isopropanolilla ja 1 kerta 0,3 M Na-asetatti/2,5 til. etanolilla ja liuotettiin 15 μ l:aan 0,1 x TE-puskuria. BamHI/EcoRI-linkkerit jäävät tässä menetelmässä liuokseen. EMBL3A-fractiontit (8 μ g) yhdistettiin noin 5 μ g) yhdistettiin noin 5 μ g:n kanssa 10 - 23 kb hevos-DNA:a ja 10 yksikön kanssa T4-DNA-likaasia (NEN) ja inkuboitiin yön yli 14°C:ssa ja yksi päivä 4°C:ssa 50 μ l:ssa ligatointimeidiumia (66 mM Tris-HCl pH 7,2, 0,1 m NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM ditiotreitol, 0,5 mM ATP). Ligatoitu DNA-seos pakattiin valmiisiin Lambda-faagipartikkeleihin in vitro-Lambda-pakkausyhteisöissä (Schalenghe, F. et al; Chromosoma, 82, 205-216 (1981)).
- 25 Tämän systeemin komponentit, so. ultraääniliuute (SE), pakastus-sulatus-lysaatti (FTL), puskurit M1 ja A valmistettiin mainitun artikkelin (Schalenghe. F. et al; Chromosoma, 82, 205-216 (1981)) mukaisesti. Ligatoidun DNA-seoksen 10 μ l:n suuruisia erää inkuboitiin 2 minuuttia huoneen lämpötilassa 25 μ l:n kanssa SE-uutetta, joka myös oli sulatettu jäistä 30 minuutin aikana kuten FTL-lysaattikin, lisättiin 100 μ l FTL-lysaattia ja inkuboitiin edelleen 60 minuuttia huoneen lämpötilassa. Pakkausseos laimennettiin 150 μ l:lla Lambda-laimenninta (100 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgSO₄ 1 Mm EDTA) ja säilytettiin 4°C:ssa.

4. Hevos- γ -interferonin (EqIFN- γ) geenin kloonaus ja sekvenssointi

A. Täydellisen EqIFN- γ -geeni-kloonin eristäminen

5

E.coli NM528 (supF) kannan infektointiin käytettiin hevos-DNA-kirjastoa. Bakteeriviljelmä, jota oli yli yön kasvatettu LB-ravintoliuoksessa (10 g/l tryptoni, 5 g/l hiivauute, 10 g/l NaCl, pH 7,4) joka sisälsi 0,2% maltoosia, säädettiin 10 mM MgSO₄:ssa 2,0 optiseen tiheyteen (600 nm). Tämän suspension kulloinkin 0,5 ml:n suuruiset erät infektoitiin 50.000 pfu-yksiköllä (plakinmuodostusyksikkö) DNA-kirjaston Lambda-faageja ja levitettiin LB-pehmytagarkerroksen kanssa LB-agar-maljoille, jotka sisälsivät 10 mM magnesiumsulfaattia (halkaisija 13,5 cm). Rekombinantti-Lambda-faageja seulottiin yhteensä $1,5 \times 10^6$. Viljeltiin yön yli 37°C:ssa, minkä jälkeen jokaisen maljan faageista valmistettiin kaksinkertaiset kopiot nitroseluloosalla (Benton ja Davis, Science 196:180-182, 1977)).

Faagi-DNA:n denaturoinnin jälkeen (1 minuuttia seoksessa: 0,5 N NaOH, 1,5 M NaCl), neutraloinnin (2 kertaa 3 minuuttia seoksessa: 0,5 M Tris-HCl pH 7,5 1,5 M NaCl) ja huuhtelun jälkeen (1 minuuttia seoksessa: 2 x SSC, 1 x SSC, 0,15 M NaCl, 15 mM Na-sitraatti) kuivattiin suodattimen ilmassa ja DNA kiinnitettiin paistamalla 2 tuntia 80°C:ssa. Suodattimia pestiin yön yli 65°C:ssa liuoksessa 1,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1% SDS, ja esihybridisoitiin 4 - 6 tuntia 65°C:ssa (hybridisointiliuos: 0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄, pH 7,4, 5 mM EDTA, 0,1% Ficoll, 0,1% polyvinylipyrrolidoni, 0,1% naudanseerumialbumiini, 0,1% SDS, 20 mg/ml ultraäänikäsitelty ja denaturoitu lohensperma-DNA). Hybridisointi suoritettiin 20 tunnin aikana 65°C:ssa juuri valmistetussa liuoksessa, joka sisälsi suodatin-kohti 10^6 cpm tavanomaisilla menetelmillä radioaktiivisesti leimattua HuIFN- γ "koetinta". Suodattimet pestiin ei-stringenteissä olosuhteissa 3 x SSC, 0,1% SDS-seoksessa 65°C:ssa ja autoradiografoitiin. Kolmen plakkipuhdistuksen suorittamisen

jälkeen voitiin tunnistaa viisi Lambda-kloonia, jotka antoivat positiiviset hybridisoitumissignaalit.

DNA puhdistettiin näistä eristetyistä rekombinantti-faageista tavanomaisilla menetelmillä (Maniatis et al., Ibid.). Erilaisilla restriktioentsyymeillä pilkkomisen ja tämän jälkeisen Southern-analyysin (Southern, J.Mol. Biol. 98: 503-517, 1975) jälkeen faagi-DNA:t karakterisoitiin hybridisoimalla HuIFN- γ "koettimen" kanssa. Eristettiin yksi ainutkertaisesti hybridisoituva kloonin Lambda Eq- γ 2 4,6 kb pitkä BamHI-fragmentti ja tämä kloonattiin pUC9-plasmidin BamHI-katkaisukohtaan (Vieira ja Messing, Gene 19: 259-268, 1982). E.coli JM101-kannan transformoinnin jälkeen valmistettiin saaduista pesäkkeistä minipreparointimenetelmällä (Birnboim ja Doly, Nucl. Acids Res. 7: 1513-1523, 1979) plasmidi-DNA ja karakterisoitiin pilkkomalla restriktioentsyymeillä. Plasmidille, jolla oli haluttu BamHI-insertti, annettiin nimeksi pAH111. Plasmidin pAH111 BamHI-insertin päät, sen jälkeen kun mukaan oli laitettu M13mp8- tai M13mp9-vektorit (Vieira ja Messing, Gene 19, 259-268, 1982), sekvenssoitiin Didesoxy-menetelmällä (Sanger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467, 1977). Sekvenssien vertaaminen ihmis- γ -interferonigeenin (Gray ja Goeddel, Nature 298: 859-863, 1982) kanssa osoitti homologia olevan suuren koodaamattomien 5'- ja 3'-alueiden välillä. Tästä voitiin päätellä, että oli eristetty täydellinen EqIFN- γ -geeni.

B. Kloonista Lambda Eq- γ 2 saadun hevos- γ -interferonigeenin sekvenssointi.

pAH111-plasmidin 4,6 kb pitkä BamHI-insertti sekvenssoitiin täydellisesti Didesoxy-menetelmällä. BamHI-fragmentin koko sekvenssi saatiin yhdistämällä M13-alikloonien osasekvenssit, jotka oli saatu kloonamalla suunnatulla tavalla restriktiofragmentit (EcoRI, HindIII, PstI, PstI-BglII, HindIII-BamHI) vastaavasti pilkottuihin M13mp8 tai M13mp9-vektoreihin. Lisää osasekvenssejä saatiin siten, että 2,0 kb pitkä BamHI-BglIII-

- fragmentti tai 2,0 kb pitkä PstI-fragmentti kloonattiin "hau-
likkometelmällä" M13mp8-vektoriin. Kummatkin DNA-fragmentit
hajotettiin ultraäänien avulla pienemmiksi palasiksi ja DNA-päät
tasattiin inkuboimalla E.coli DNA-polymeraasin I (Klenowin
5 fragmentti) kanssa, kun mukana oli 0,1 mM kutakin neljää desok-
sinukleotidifosfaattia (reaktiopuskuri: 50 mM Tris-HCl pH 7,5,
10 mM MgCl₂, 1 mM ditiotreitti, 0,5 mg/ml naudanseerumialbu-
miini: 1 h 25°C:ssa). Fraktioitiin koon perusteella agarosi-
geelissä, minkä jälkeen eristettiin DNA-fragmentit, joiden pi-
10 tuus oli noin 0,4 - 1,0 kb, ja ligatoitiin M13mp8-vektorin
SmaI-katkaisukohtaan. Saadut osasekvenssit yhdistettiin tietö-
koneohjelman avulla 4664 bp pitkäksi kokonaissekvenssiksi, joka
on esitetty kuviossa 1.
- 15 Hevos-γ-interferonigeenin proteiineja koodaava alue saatiin
avoimen lukukehyksen tietokoneen tukeman analyysin avulla ja
vertaamalla muiden lajien γ-interferonigeeneihin (Gray ja
Goeddel, Nature 298: 859-863; Grau ja Goeddel, Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 80: 5842-5846, 1983; Dijkema et al., EMBO J. 4:
20 761-767, 1985; Gerretti et al., J. Immunology 136: 4561-4564,
1986). Proteiineja koodaavan alueen katkaisee kolme intronia,
jolloin ensimmäisessä eksonissa on koodattu 20 aminohappoa pit-
kä, hydrofobinen signaalipeptidi ja valmiin EqIFN-γ-polypepti-
din 18 aminohappoa (emäket 366-479). Toinen eksoni koodaa
25 aminohappoja 19 - 41 (emäket 1639 - 1707), kolmas koodaa
aminohappoja 42 - 102 (emäket 1803 - 1985) ja neljäs eksoni
koodaa karboksi-päätä, jossa on aminohapot 103 - 146 (emäket
3307 - 3441). Kohdissa 4010 ja 4020 on mRNA:n polyadenylaation
2 signaalsekvenssiä (AATAAA). Valmiin EqIFN-γ-polypeptidin
30 asemissa 86 - 88 on ainoa mahdollinen N-glykolysaatiokohta
(Asn-Ser-Ser), joka sopii yhteen naudan γ-interferonin toisen
N-glykolysaatiokohdan (Asn-Gly-Ser) kanssa (kuvio 2). Valmis
EqIFN-γ-polypeptidi sisältää yllättäen vain yhden ainoan kyste-
iiniyryhmän asemassa 3, jolloin luonnonmukaisten ihmis- ja
35 hiiri-γ-interferonien kanssa analogisesti ensimmäiset kolme

amino-terminaalista aminohappoa (tässä tapauksessa Tyr-Tyr-Cys) todennäköisesti lohkaistaan protolyytisesti organismeissa.

5. Synteettisen geenin valmistaminen valmiille EqIFN-γ:lle

5

Rekombinantti-EqIFN-γ:n ekspressoimiseksi valmiissa muodossaan Escherichia coli -bakteerissa rakennettiin synteettinen geeni oligonukleotideistä. Se koodaa samaa aminohapposekvenssiä kuin luonnonmukainen EqIFN-γ-geeni, mutta se sisältää kuitenkin ai-
10 noastaan sellaisia yksittäisiä aminohappojen kodonia, joita käytetään E.colin suuresti ekspressoimissa, solun omissa gee-
neissä (Gouy ja Gautier, Nucl. Acids Res. 10: 7055-7074, 1982).
Lisäksi rakennettiin mukaan useita ainutkertaisia restriktio-
entsyymien katkaisukohtia, mikä mahdollistaa geenin yksinker-
15 taisten manipuloinnin, kun halutaan muuttaa yksittäisiä paloja.
EqIFN-γ:n synteettinen geeni rakennettiin kahtena muunnelmana
yhteensä 16 erilaisesti oligonukleotidista. Ensimmäinen muun-
nelma koodaa valmista EqIFN-γ:aa, jossa on 146 aminohappoa plus
aloitus-metioniini ja toinen muoto koodaa aminopäässä kolmen
20 aminohapon verran (Tyr-Tyr-Cys) lyhennettyä polypeptidiä plus
aloitus-metioniinia, jollaisena se luultavasti saattaa esiintyä
luonnonmukaisessa organismeissa.

Synteettisen EqIFN-γ:n rakenne on esitetty kuviossa 3. Valmis-
25 tamiseen käytetyt oligonukleotidit syntetisoitiin Applied Bio-
systems Model 381A DNA-syntetisointilaitteen avulla, puhdistet-
tiin elektroforesoimalla denaturoiduissa 12-prosenttisissa po-
lyakryyliamidigeeleissä (7 M urea) ja suolat poistettiin eks-
kluusiokromatografian avulla Sephadex G-25:lla (Pharmacia).

30

Oligonukleotidien kokoaminen synteettiseksi EqIFN-γ-geeniksi

Synteettisen EqIFN-γ-geenin rakentaminen tapahtui kahtena pala-
na. Geenin ensimmäinen osa valmistettiin kahdeksan oligonukleo-
35 tidin EG-1 - EG-8 avulla SalI-katkaisukohtaan asti ja geenin
toinen puolisko kuudesta oligonukleotidista EG-9 - EG-14 SalI-

katkaisukohdasta BamHI-katkaisukohtaan asti. Aminopäässä kolmen aminohapon verran lyhennettyyn EqIFN- γ -muotoon käytettiin oligonukleotideja EG-15 ja EG-16 oligonukleotidien EG-1 ja EG-2 asemesta.

5

Keskenään komplementtiset oligonukleotidit fosforyloitiin kulloinkin parittain 5'-päässä. Kulloinkin 100 pmoolia kumpaakin oligonukleotidia (esimerkiksi EG-3 ja EG-4, tai EG-5 tai EG-6 jne.) inkuboitiin 10 minuuttia 37°C:ssa 9 μ l:ssa kinaasi-puskuria (70 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM ditiotreiitti), 2 μ Ci [γ -³²P]ATP (Amersham) käyttämällä 10 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia (New England Biolabs), tähän lisättiin 1 μ l 10 mM ATP-liuosta ja inkuboitiin vielä 50 minuuttia 37°C:ssa. Reaktio pysäytettiin kuumentamalla 10 minuuttia 95°C:ssa. DNA-päiden myöhempi liittyminen estettiin jättämällä fosforyloimatta oligonukleotidit EG-1, EG-15, EG-9 ja EG-14. Ne sekoitettiin kyseisen komplementtisen oligonukleotidin kanssa vasta polynukleotidikinaasin inaktivoinnin jälkeen, kuumennettiin 5 minuuttia 95°C:ssa ja jäädytettiin huoneen lämpötilaan.

20

Oligonukleotidin EG-1+2 (tai toisessa osassa EG-15+16), EG-3+4, EG-5+6 ja EG-7+8 seokset yhdistettiin, seokseen lisättiin 1 μ l 5 M natriumkloridia, kuumennettiin 5 minuuttia 70°C:ssa ja jäädytettiin huoneen lämpötilaan. Tähän liuokseen lisättiin 5 μ l 10 mM ATP:a, 2 μ l ditiotreiittiä, 1,5 μ l 10 x ligatointipuskuria, (0,66 M Tris-HCl pH 7,2, 1 M NaCl, 100 mM MgCl₂, 10 mM EDTA, 50 mM ditiotreiitti) ja 80 yksikköä T4 DNA-ligaasia (new England Biolabs) ja inkuboitiin 48 tuntia 4°C:ssa. Ligasireaktion kulkua seurattiin erottamalla geelielektroforeettisesti pienen reaktioerän DNA-fragmentit 5%:ssa, ei-denaturoivassa polyakryyliamidigeelissä ja sen jälkeen autoradiokrafoimalla. Samalla tavalla liitettiin keskenään kuusi oligonukleotidia EG-9 - EG-14. Reaktio pysäytettiin uuttamalla fenolin ja kloroformin seoksessa ja DNA saatiin saostamalla etanolilla.

35

6. Ekspressioplasmidin pRH 100 rakentaminen

Kaikki entsyymireaktiot suoritettiin valmistajien antamissa olosuhteissa.

5

7 μ g plasmidia pER103 (Eva Dworkin-Rastl et al., Gene 21 (1983) 237-248, EP-A-0.115-613) linearisoitiin 50 μ l:ssa reaktiomediumia restriktioendonukleasilla HindIII. Inkuboitiin 1 tunti 37°C:ssa, minkä jälkeen lisättiin 50 μ l 2 X DIP-puskuria (2 x

10 CIP-puskuri = 20 mM Tris, pH = 9,2, 0,2 mM EDTA). 5'-terminaaliset fosfaattiryhmät poistettiin lisäämällä 2 yksikköä vaskansuolesta saatua alkalista fosfataasia (CIP); inkubointi kesti 30 minuuttia 45°C:ssa. Reaktio pysäytettiin lisäämällä 4 μ l 0,5 mM EDTA-liuosta sekä lisäämällä 10 μ l 1M Tris, pH = 8,0

15 liuosta. Proteiinit poistettiin uuttamalla 2 kertaa fenolilla ja kerran fenolilla ja kloroformilla. DNA saostettiin vesifaasista lisäämällä 0,1 til. 3 M natriumasetaattiliuosta pH = 5,5 ja 250 μ l etanolia ja DNA-sakka pestiin sentrifugoinnin jälkeen kerran 70%:lla etanoliliuoksella. DNA kuivattiin ja sen jälkeen
20 pelletti liuotettiin 20 μ l:aan TE-puskuria (10 mM Tris pH = 8,0, 1 mM EDTA).

1 μ g kutakin synteettisesti valmistettua oligonukleotidia d(AGCTTAAAGAATGAGCT) ja d(CATCTTTA) fosforyloitiin kulloinkin
25 10 μ l:ssa reaktioliuosta lisäämällä 10 yksikköä T4-PNK-entsyymiä (polynukleotidikinaasi) sekä 1 mM rATP:a. Reaktio tapahtui 37°C:ssa ja kesti 45 minuuttia. Reaktio pysäytettiin kuumentamalla 10 minuuttia 70°C:ssa.

30 Sekoitettiin kulloinkin 5 μ l plasmidiliuosta ja fosforyloitua oligonukleotidia ja lämmitettiin 5 minuuttia 70°C:ssa. Tämän jälkeen liuos jäädytettiin 0°C:een ja lisättiin 2 μ l 10 x liigaasipuskuria (500 mM Tris, pH = 7,5), 100 mM MgCl₂:a, 200 mM DTT:a (ditiotreiitti), 1 mM rATP:a, 500 μ g/ml BSA:a (nauhaseerumialbumiini) sekä 2 μ l vettä ja 10 yksikköä T4-DNA-ligaasia.
35

Reaktio kesti 40 tuntia ja se suoritettiin 4°C:ssa. Reaktio pysäytettiin kuumentamalla 10 minuuttia 70°C:ssa.

2 µl tätä ligaasireaktioseosta yhteensä 30 µl:ssa liuosta pil-
5 kottiin 3 tunnin aikana 37°C:ssa 10 yksiköllä restriktioendo-
nukleaasia SacI (New England Biolabs). Reaktio pysäytettiin
kuumentamalla 10 minuuttia 70°C:ssa. 5 ml tätä reaktioseosta
ligatoitiin 16 tuntia 14°C:ssa yhteensä 30 µl:ssa lisäämällä 10
yksikköä T4-PNK-entsyymiä.

10

200 µl:aan kompetentteja E.coli HB101-bakteereita lisättiin
10 µl tätä ligaasireaktioseosta. Bakteereita pidettiin 45 mi-
nuuttia jäällä ja sen jälkeen lämmitettiin 2 minuuttia 42°C:ssa
DNA:n sisään viennin mahdollistamiseksi. Tämän jälkeen baktee-
15 risuspensiota inkuboitiin jälleen 0°C:ssa 10 minuuttia. Tämän
jälkeen transformoidut bakteerit siveltiin LB-agarille, joka
sisälsi 50 µg/ml ampisilliiniä.

20 Muodostuneista bakteeripesäkkeistä valittiin 12 mielivaltaises-
ti ja näistä eristettiin plasmidit mikromitassa (Birnboim ja
Doly, Nucl. Acids Res. 7 (1979) 1513-1523). Saatu DNA katkais-
tiin restriktioendonukleaasilla SacI ja DNA erotettiin agaroo-
sigeelillä (1%, 1 X TBE-puskuri). DNA:n kulkeutuminen lineaa-
risena noin 4400 bp suuruisena molekyylinä vahvasti SacI-tun-
25 nistamiskohdan liittymisen plasmidiin. Yksi tällainen plasmidi
valittiin mielivaltaisesti. E.coli HB101 transformoitiin vielä
kerran siihen kuuluvan minipreparaatin DNA:lla. Saaduista
transformoiduista bakteereista valittiin yksi pesäke ja sitä
viljeltiin suuremmassa mitassa. Tästä eristetty plasmidi pil-
30 kottiin restriktioendonukleaaseilla EcoRI ja BamHI. DNA erotet-
tiin 1%:lla agarosigeelillä ja pienempi fragmentti eristettiin
geelistä elektroeluoimalla. Tämä noin 460 bp pitkä EcoRI-BamHI-
DNA-fragmentti sekvenssoitiin Sangerin menetelmällä (F. Sanger
et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (1977) 5463-5467). Tällä tavoin
35 analysoiduille plasmidille annettiin nimeksi pRH100.

7. Synteettisen E α IFN- γ -geenin vienti ekspressioplasmidiin pRH100

10 μ g plasmidia pRH100 pilkotaan täydellisesti 100 μ l:ssa reaktiopuskuria SacI:lla ja entsyymi inaktivoidaan kuumentamalla
5 10 minuuttia 70°C:ssa. Ylipitkät DNA-päät tasataan käsittelemällä Klenowin fragmentilla (Amersham), kun mukana on 10 μ m kutakin neljää desoksinukleotiditrifosfaattia (30 minuuttia, 25°C). Reaktio pysäytetään uuttamalla fenoli/kloroformilla ja
10 DNA väkevöidään saostamalla etanolilla. Näiden käsittelyjen avulla muodostuu tryptofaanipromoottoriin liittyen tylppä DNA-pää, joka päättyy translaation aloituskodoniin "ATG". Linearisoitu plasmidi-DNA jälkipilkotaan BamHI:lla ja vektoriosa eristetään agarosigeelistä elektroforeettisen erottamisen jälkeen.

15

50 ng edellä kuvatulla tavalla esivalmistettua pRH100 plasmidivektoria sekoitettiin 20 pmoolin kanssa ligatoituja oligonukleotideja EG-1 - EG-8 ja EG-9 - EG-14 ja inkuboidaan 24 tuntia 14°C:ssa 10 μ l:ssa ligatointipuskuria (66 mM Tris-HCl pH
20 7,2, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 5 mM ditiotreitti, 1 mM ATP) yhden yksikön kanssa T4 DNA-ligaasia (Boehringer Mannheim). Tällä ligatointiseoksella transformoidaan kalsiumkloridikäsittelyllä kompetentiksi tehty E.coli JM101 ja inkuboidaan yön yli 37°C:ssa. Saaduista transformanteista eristetään plasmidi-DNA minipreparointimenetelmällä ja rakenne selvitetään HindIII-BamHI-insertin restriktioanalyysin ja sekvenssoinnin avulla. Plasmidille, jolla on valmiin E α IFN- γ :n ekspressoinnille haluttu rakenne, annetaan nimeksi pEqG-YYC1. Täysin analogisella tavalla kloonataan oligonukleotidit EG-15,16,
25 EG-3 - EG-8 ja EG-9 - EG-14 pRH100-vektoriin, jotta saataisiin kolmen aminohapon verran lyhennetty E α IFN- γ . Rakenteeltaan halutulle plasmidille annetaan nimeksi pEqG-QAA1.

35

8. E.coli JM101 bakteereiden, jotka sisältävät plasmidin pEgG-YYC1 tai pEgG-OAA1, interferoniaktiivisuuden ekspressio

- 100 ml bakteeriviljelmää inkuboidaan 37°C:ssa voimakkaasti
5 ravistellen seuraavassa tryptofaanittomassa alustassa
(luvut alustalittraa kohti): 10 g (NH₄)₂PO₄, 3,5 g KH₂PO₄ pH 7,3
NaOH:lla, 0,5 g NaCl, 21 g cakaminohapot (happohydrolysoidut),
20 mg L-kysteiini, 20 mg 3-β-indoliakryylihapo (IAA, trypto-
faanioperonin indusori) haluttaessa 50 - 100 mg ampisilliini.
10 Tämän jälkeen bakteerit pelletoidaan sentrifugoimalla 5 minuut-
tia nopeudella 4000 kierrosta minuutissa, suspendoidaan 1/10
viljelytilavuudella jääkylmään 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 30 mM
NaCl -puskuria ja hajotetaan jäissä jäädyttäen 2 kertaa 30
sekunnin ajan ultraäänielektrodin avulla (20 kHz, 100 Wattia).
15 Solujäännökset poistetaan 10 minuutin aikana nopeudella 10000
kierrosta minuutissa (4°C) ja steriilisuodatuksen jälkeen tes-
tataan supernatantista interferoniaktiivisuus määrittäessä,
joka mittaa VS-viruksen (Vesicular Stomatitis virus) tai EMC-
viruksen (Encephalomyocarditis virus) sytopaattisen vaikutuksen
20 (CPE).

Testaussysteemi:

- NBL-6 solut (ATCC CCL 57, hevosen ihon epidermisolut)/VSV A549
25 (ATCC CCL 185, ihmisen keuhkokarsinoma-solulinja)/EMCV

A 549-solujen tiitteri normitetaan ihmisen interferonistandar-
din avulla kansainvälisiksi yksiköiksi.

- 30 9. Ekspressoitujen hevos-interferonien osoittaminen leimaamalla
proteiinit maksisoluissa

- Plasmidikoodattuja proteiineja voidaan leimata selektiivisesti
in vivo käyttämällä maksisolutekniikkaa. E.coli CSR603 trans-
35 formoidaan tavanomaisella menetelmällä ekspressioplasmideilla
ja transformoidut bakteerit selektoidaan ambisilliinipitoisella

agar-maljoilla. Maksisolujen valmistaminen ja proteiinien leimaaminen tapahtuu A. Sancarin (a.a.o.) ohjeen mukaisesti. Soluja viljellään 15 ml:ssa alustaa (kts. esimerkki 8) ilman indoliakryylihappoa 37°C:ssa optiseen tiheyteen $OD_{600nm}=0,5$ asti ja
 5 10 ml tätä viljelmää säteilytetään petrimaljalla 5 sekuntia 50 cm:n etäisyydeltä UV-germisidi-lampulla (15 wattia) samalla käännellen ja inkuboidaan edelleen 1 tunti 37°C:ssa. Viljelmiin lisätään 100 µg/ml D-sykloseriiniä, inkuboidaan 14 tuntia 37°C:ssa ja sen jälkeen bakteereista poistetaan tumat sentrifugoimalla. Solut pestään 2 kertaa 5 ml:lla Hershey-suolaliuosta, suspendoidaan 5 ml:aan Hershey-alustaa, jossa on 20 µg/ml indoliakryylihappoa, ja inkuboidaan 2 tuntia 37°C:ssa. Jokaiseen viljelmään lisätään 5 µCi/ml ^{35}S -metioniinia (1000 Ci/mMol) ja ravistellaan 1 tunti 37°C:ssa. Solusta poistetaan tumat SDS-
 15 liuoksessa ja lyysataan 2-merkaptetaanoli-pitoisessa elektroforeesi-koetinpuskurissa ja proteiinit erotetaan 15%:lla polyakryyliamidigeelillä.

Hershey-suolaliuos (litraa kohti)	Hershey-alusta (100 ml:aa kohti Hershey-suolaliuosta)
5,4 g NaCl	2 ml 20 % glukoosi
3,0 g KCl	0,5 ml 2 % treoniini
1,1 g NH_4Cl	1,0 ml 1 % leusiini
15 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,0 ml 2 % proliini
0,2 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	1,0 ml 2 % arginiini
0,2 mg $FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,1 ml 0,1% tiamiini
87 mg KH_2PO_4	
12,1 g Tris-HCl pH 7,4	

30 Kuivatun geelin autoradiogrammi valmistetaan 2 päivän jälkeen valottamalla DuPont Cronex röntgenfilmillä käyttämällä Kodak Lanex-Regular vahvistusfoliota -80°C:ssa. Molekyylipainostandardina käytetään ^{14}C -metyloitua proteiiniseosta (Amersham).

35 Kontrolleina toimivat plasmidi pER103, joka sisältää nyt pro-

moottorin ilman interferonigeeniä, ja plasmidi pER21/1, joka sisältää kaksi kopiota humaani IFN- α 2arg-geeniä.

5 10. EqIFN- γ :n kanssa hybridisoituvien sekvenssien osoittaminen genomisessa hevos-DNA:ssa

Seuraavalla tavalla osoitetaan niiden sekvenssien kokonaismäärä hevosgenomissa, joilla on korkea homologia interferonigeenin EqIFN- γ kanssa. 30 μ g suurimolekyylistä hevos-DNA:a (esimerkki 10 1) pilkotaan täydellisesti 100 yksiköllä vastaavaa restriktio-entsyymiä 300 μ l:n reaktiutilavuuksissa ja kulloinkin erotetaan koon perusteella 10 μ g tätä pilkottua DNA:a rataa kohti 0,8%:lla agarosigeelillä.

15 DNA Southern-siirretään nitroselluloosasuodattimille, denaturoidaan ja kiinnitetään, minkä jälkeen jokainen suodatin hybridoidaan noin 6×10^6 cpm radioaktiivisesti leimatun "koettimen" kanssa (17 tuntia 65°C:ssa, 5 x SSC, 5 x Denhardtin liuos, 0,1% SDS, 20 μ g/ml denaturoitua lohensiittiö-DNA:a). EqIFN- γ :n 20 "koettimena" käytetään plasmidista pEqG-YYC1 saatua fragmenttia, joka sisältää koko valmista interferonia koodaavan sekvenssin. Tämän jälkeen suodattimet pestään stringenteissä olosuhteissa: 4 x 45 minuuttia 65°C:ssa seoksella: 45 mM NaCl, 4,5 mM Na₃ sitraatti), 0,1% SDS. Autoradiografia tapahtuu 25 Du-Pont Cronex röntgenfilmillä käyttämällä Kodak Lanex-Regular vahvistusfolioita 7 päivää -80°C:ssa.

30 11. Hevos-interferoni- γ :n (OAA) ekspressio E.coli HB101/pEqG-OAA2:ssa ja HB101/pEqG-OAA3:ssa

Jotta ekspressio saataisiin paremmaksi, käytettiin a) parannettuja ekspressiovektoreita ja b) parannettua ribosomaalista sitoutumiskohtaa. Parannetut ekspressiovektorit perustuvat Serratia marcescens -bakteerista (Sma) saatuun trp-promoottoriin, 35 joka yksi emäs vaihtamalla tulee -35 alueella yhtäläiseksi yhteisen -35 alueen kanssa (pRH281), tai hybridi-trp-promootto-

riin, jossa on *Escherichia coli* -bakteerin (Eco) ensimmäinen A/T-rikasalue tai toinen A/T-rikasalue plus Sma:n promoottori (pRTH282, S. Itoh, Gene 44 (1966), 29-36). Ribosomaalisina sitoutumiskohtina käytettiin *E. coli* enterotoksiini II:n kohtia.

5

a) pRH281/5

Seuraavat oligonukleotidit valmistettiin Applied Biosystems DNA Synthesizer 381A laitteen avulla:

10

Trp-1: 5'-AATTGACGCTG-3'

Trp-3: 5'-ATCGCTAAAACATTGTGCAAAAAGAGGGATTGACATTGCCTTCGCGAACCA
GTTAACTAGTACACA-3'

Trp-5: 5'-AGTTCACGGCTCGAGACGGTAAGGAGGTTTAATATGAGCTCGAATTCAT-3'

15 Trp-2: 5'-TTAGCGATCAGCGTC-3'

Trp-4: 5'-CGTGAACCTTGTGTACTAGTTAACTGGTTCGCGAAGGCAATGTCAACCCT
CTTTTTGCACAATGTT-3'

Trp-6: 5'-CGATGAATTCGAGCTCATATTAAACCTCCTTACCGTCTCGAGC-3'

20 100 pmoolia kutakin oligonukleotidia Trp-2 - Trp-5 fosforyloitiin erikseen 10 μ l:ssa. Trp-1 ja -2, Trp-3 ja -4 sekä Trp-5 ja -6 hybridisoitiin kiehauttamalla ja jäähdyttämättä hitaasti. Oligonukleotidipariliuokset yhdistettiin ja ligatoitiin lisäämällä T4-DNA-ligaasia. 3 μ g pAT153:a kaksoispilkottiin
25 EcoRI:lla ja ClaI:lla. Suuren fragmentin puhdistamisen jälkeen tähän lisättiin noin 20 pmoolia oligonukleotideja ja ligatoitiin. Tämän jälkeen DNA transformoitiin *E. coli* HB101:ssa ja joidenkin saatujen pesäkkeiden plasmidit eristettiin. Promoottorin sisältä Pst-HindIII-fragmentti sekvensoitiin. Halutun
30 sekvenssin toteamisen jälkeen voitiin yksi plasmidi ja tälle annettiin nimeksi pRH281/5.

Promoottoriosan sekvenssi on:

-35

5' -GAATTGACGCTGATCGCTAAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACATTGC

3' -CTTAACTGCGACTAGCGATTTTGTAACACGTTTTTCTCCCAACTGTAACG

5

XhoI

-10

|transkription alku

CTTCGCGAACCAGTTAACTAGTACACAAGTTCACGGCTCGAGACGGTAAG

GAAGCGCTTGGTCAATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGAGCTCTGCCATTC

10

RBS

SstI EcoRI ClaI

GAGGTTTAATATGAGCTCGAATTCATCGAT-3'

CTCCAAATTATACTCGAGCTTAAGTAGCTA-5'

Uuden ekspressiovektorin etuja ovat:

15

1) optimaalinen -35 alue trp-Sma promoottorissa

2) ainutkertainen XhoI-kohta ennen ribosomaalista sitoutumis-
kohtaa (RBS) mahdollistaa RBS:n vaihtamisen toiseen

20

3) ekspressioplasmidi sisältää yhden translaation aloituskohdan
ATG viiden nukleotidin verran RBS:n jälkeen

25

4) tämä ATG:n G on SstI-tunnistamissekvenssin (GAGCTC) ensimmäinen emäs. Katkaisemalla SstI:lla ja sen jälkeen muodostamalla suora pää saadaan käyttöön ekspressiovektori, jolla on translaation aloitusviiva ATG ja jonka viereen voidaan ligatoida vieras geenin alkaen lukukehyksen ensimmäisestä emäksestä

30

5) yhdistelmä RBS-ATG ei sisällä lainkaan G:a tai C:a

35

6) alkuperäinen EcoRI-katkaisukohta tuhottiin valitsemalla oligonukleotidisekvenssi 5'-päähän. Promoottorin 3'-päähän voidaan siten muodostaa monikloonaukskohta, joka muodostuu

SstI:sta, EcoRI:sta, ClaI:sta ja HindIII:sta (jo pAT153-osassa).

b) pRH282/5

5

Samalla tavoin rakennettiin ekspressiovektori pRH282/5. Oligonukleotidit Trp-1 ja Trp-2 korvattiin oligonukleotideilla Trp-7 ja Trp-8:

10 Trp-7:5'-AATTGCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCGCCGACATCATCATGCT-3'
Trp-8:5'-TTAGCGATCAGCATGATGATGTCGGCGCAAAAACATTATCCAGAACGGGC-3'

Promoottoriosan sekvenssi pRH282/5:ssa on:

15 5'-GAATTGCCCGTTCTGGATAATGTTTTTTGCGCCGACATCATCATGCTGAT
3'-CTTAACGGGCAAGACCTATTACAAAAACGCGGCTGTAGTAGTACGACTA

-35

CGCTAAACATTGTGCAAAAAGAGGGTTGACATTGCCTTCGCGAACCAGT
20 GCGATTTTGTAAACACGTTTTTCTCCCAACTGTAACGGAAGCGCTTGGTCA

XhoI

-10 |transkription alku RBS
TAACTAGTACACAAGTTCACGGCTCGAGACGGTAAGGAGGTTTAATATGA
25 ATTGATCATGTGTTCAAGTGCCGAGCTCTGCCATTCCTCCAAATTATACT

SstI EcoRI ClaI
GCTCGAATTCATCGAT-3'
CGAGCTTAAGTAGCTA-5'

30

c) pGN1

1 µg plasmidia pUC18 kaksoispilkottiin BamHI:lla ja SalI:lla.

10 µg:sta EqG-QAA1 plasmidia eristettiin BamHI-SalI-kaksois-

35 pilkkomisen avulla synteettisen hevos-γ-interferoni-geenin toinen puolisko ja tämä defosforyloitiin. Noin 20 nanogrammaa vek-

toria ligatoitiin 100 nanogramman kanssa inserttiä ja DNA transformoitiin E.coli JM101:ssa. Yhden pesäkkeen plasmidi tutkittiin pilkkomalla restriktioentsyymeillä ja tälle annettiin nimeksi pGN1.

5

d) pGN3

Synteettisen geenin ensimmäinen puolisko koottiin yhdessä ribosomaalisen sitoutumiskohdan kanssa oligonukleotideistä:

10

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

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

15 EqG-3: 5'-ATCGTTTCTTTCTACTTCAAACCTGTTGAAAACCTGAAAGACAACCAGGT
TATCCAGAAATCGATGGACACTATCAAAGAAGATCTGTTTCGTTAAATTCT
TCAACTCGTCGACTCCG-3'

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

EqG-5: 5'-GATGATCTTTTTGTGTCAGAGTCTTCTTTCCAGTTTTTCAGGATGTCCAGGA
ACAGCGGACCACCGTCACCAACGTC-3'

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

25

50 moolia kutakin oligonukleotidia fosforyloitiin, erityisesti:

EqG-2 yhdessä EqG-5:n kanssa 7 μ l:ssa, EqG-3 ja EqG-8 yksinään kulloinkin 8 μ l:ssa. Kinaasireaktio pysäytettiin kuumentamalla 100°C:een. EqG-3:een lisättiin 50 pmoolia EqG-4:aa (1 μ l) ja EqG-8:aan lisättiin 50 pmoolia EqG-1:a (1 μ l) ja EqG-8:aan lisättiin 50 pmoolia EqG-1:a (1 μ l). Nämä liuokset kuumennettiin vielä kerran 100°C:een ja jäähdytettiin hitaasti. Oligonukleotidipariliuokset yhdistettiin ja ligatoitiin T4-DNA-ligaasin kanssa yhteensä 30 μ l:ssa. 2 μ g pUC18-plasmidia kaksoispilkotettiin EcoRI:lla ja HindIII:lla, vektoriosa geelipuhdistettiin ja liuotettiin 50 μ l:aan vettä. 40 nanogrammaa vektoria ja

35

noin 2 pikomoolia ligatoituja oligonukleotideja ligatoitiin 10 μ l:ssa ja tämän jälkeen DNA transformoitiin E.coli JM101:ssa.

- 5 Yhden saadun plasmidin EcoRI-HindIII-insertti kloonattiin uudelleen plasmidin M13mp9 ja tutkittiin sekvenssi. Valittiin plasmidi, jolla oli odotetunlainen sekvenssi, ja tälle annettiin nimeksi pGN3.

- 10 e) pGN20

Noin 3 μ g plasmideja pGN1 ja pGN3 kaksoispilkottiin HindIII:lla ja SalI:lla. pGN3:n insertti ja pGN1:sta saadun Eq- γ -interferoni-geenin vektori/2. puolisko geelipuhdistettiin. 0,2 μ g pGN-
15 3-plasmidia ligatoitiin noin 0,05 μ g:n kanssa pGN3-inserttiä ja DNA transformoitiin E.coli JM101:ssa. Saadun kloonin plasmidi valittiin restriktiokuvion tutkimisen jälkeen ja tälle annettiin nimeksi pGN20.

- 20 f) pEqG-QAA2 tai pEqG-QAA3

Noin 10 μ g:sta plasmidia pGN20 eristettiin XhoI-EcoRI-insertti, joka sisältää synteettisen hevos- γ -interferoni-geenin yhdessä E.coli enterotoksiini II:n ribosomaalisen sitoutumiskohdan
25 kanssa (C.H. Lee et al., Infect. Immun. 42 (1983), 264-268; S.L. Moseley et al., Infect. Immun. 39 (1983), 1167-1174)).
pRH281/5 tai pRH282/5 kaksoispilkottiin XhoI:lla ja EcoRI:lla.
20 nanogrammaa vektoria ligatoitiin 20 nanogramman kanssa inserttiä ja DNA transformoitiin E.coli HB101:ssa. Valittiin
30 muutama pesäke, eristettiin plasmidit ja nämä tutkittiin restriktioanalyysin avulla. Kulloinkin valittiin yksi plasmidi ja tälle annettiin nimeksi pEqG-QAA2 (vektori: pRH281/5) tai pEqG-QAA3 (vektori pRH282/5).

g) Lysaattitesti interferoni- γ -aktiivisuudelle

Yön yli vanha E.coli HB101/pEqG-QAA2 tai HB101/pEqG-QAA3-viljelmä laimennettiin 1:100 LB/Amp:lla (LB: 10 g/l tryptoni,
5 5 g/l hiivauute, 5 g/l NaCl, 50 mg/l ampisilliini) ja inkuboitiin edelleen 37°C:ssa. Kun optiseksi tiheydeksi (600 nm) oli saavutettu 0,3, lisättiin 50 mg/l indoliakryylihappoa ja viljelmää inkuboitiin vielä 2 tuntia 37°C:ssa. Bakteerit erotettiin sentrifugoimalla ja hajotettiin ultraäänien avulla. Steriili-
10 lisuodatetusta supernatantista testattiin NBL-6 soluilla (ATCC CCL 57) γ -interferoniaktiivisuus, jolloin viruksena käytettiin VSV (Vesicular Stomatitis virus) -virusta. Kummankin transformoidun bakteeriviljelmän (E.coli HB101/pEqG-QAA2 tai HB101/pEqG-QAA3) lysaattien interferoniaktiivisuudet olivat
15 noin 0,1 - 1 miljoonaa yksikköä/ml. Kontrollia varten testattiin identtisesti valmistettu E.coli HB101/pRH281 lysaatti. Tämän kontrollilysaatin aktiivisuus oli alle 100 yksikköä/ml.

Patenttivaatimukset

1. Rekombinantti DNA-molekyyli, t u n n e t t u siitä, että se käsittää hevos-interferoni-γ:aa koodaavan sekvenssin:

5

R¹ TAC TGC CAG GCT GCT TTC TTT AAA GAA ATC GAA AAC CTG AAA
GAA TAC TTC AAC GCT CGT AAC CCA GAC GTT GGT GAC GGT GGT CCG
CTG TTC CTG GAC ATC CTG AAA AAC TGG AAA GAA GAC TCT GAC AAA
AAG ATC ATC CAG TCT CAG ATC GTT TCT TTC TAC TTC AAA CTG TTC
10 GAA AAC CTG AAA GAC AAC CAG GTT ATC CAG AAA TCG ATG GAC ACT
ATC AAA GAA GAT CTG TTC GTT AAA TTC TTC AAC TCG TCG ACT TCT
AAA CTG GAA GAC TTC CAG AAA CTG ATC CAG ATC CCA GTT AAC GAC
CTG AAA GTT CAG CGT AAG GCT ATC TCT GAA CTG ATC AAA GTT ATG
AAC GAC CTG TCT CCA AAA GCT AAC CTG CGT AAA CGT AAA CGT TCT
15 CAG AAG CCA TTC CGT GGT CGT CGT GCT CTT CAG TAA

tai

R² GCT GCT TTC TTT AAA GAA ATC GAA AAC CTG AAA GAA TAC TTC
20 AAC GCT CGT AAC CCA GAC GTT GGT GAC GGT GGT CCG CTG TTC CTG
GAC ATC CTG AAA AAC TGG AAA GAA GAC TCT GAC AAA AAG ATC ATC
CAG TCT CAG ATC GTT TCT TTC TAC TTC AAA CTG TTC GAA AAC CTG
AAA GAC AAC CAG GTT ATC CAG AAA TCG ATG GAC ACT ATC AAA GAA
GAT CTG TTC GTT AAA TTC TTC AAC TCG TCG ACT TCT AAA CTG GAA
25 GAC TTC CAG AAA CTG ATC CAG ATC CCA GTT AAC GAC CTG AAA GTT
CAG CGT AAG GCT ATC TCT GAA CTG ATC AAA GTT ATG AAC GAC CTG
TCT CCA AAA GCT AAC CTG CGT AAA CGT AAA CGT TCT CAG AAC CCA
TTC CGT GGT CGT CGT GCT CTT CAG TAA

30 jolloin R¹ on

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

35 ATG TAT tai

TAT,

R^2

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

ATG CAG tai

10 CAG.

2. Rekombinantti-DNA-molekyyli, t u n n e t t u siitä, että se hybridisoituu jonkin patenttivaatimuksen 1 mukaisen DNA-molekyylin kanssa olosuhteissa 6xSSC/5x Denhardt'in li-
15 uos/0,1 % SDS lämpötilassa 65°C (85 % homologia) tai 0,1xSCC/0,01 % SDS/65°C (90 % homologia), jolloin tämä DNA-molekyyli voi olla synteettistä tai puolisynteettistä alkuperää ja joka koodaa EqIFN- γ biologisen ja immunologisen aktiivisuuden omaavan polypeptidin.

20

3. Rekombinantti-DNA-molekyyli, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaisen DNA-molekyylin.

25 4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen rekombinantti-DNA-molekyyli, t u n n e t t u siitä, että saatu DNA-molekyyli liittyy funktionaalisesti ekspression kontrollisekvenssiin ja että se on replikoitavissa prokaryooteissa, erityisesti E.coli-bakteerissa.

30

5. Escherichia coli-bakteeri, t u n n e t t u siitä, että se on transformoitu jonkin patenttivaatimuksen 3 tai 4 mukaisella rekombinantti-DNA-molekyyllillä, jolloin se on parhaiten E.coli JM101 tai HB101.

35

6. Menetelmä valmistaa EqIFN- γ , t u n n e t t u siitä, että
- a) Escherichia coli-bakteeri transformoidaan patenttivaatimuksen 1 - 4 mukaisella DNA-molekyyllillä,
- 5 b) transformoituja bakteereja viljellään sopivassa viljelyalustassa ja
- c) mainittu polypeptidi eristetään.

Patentkrav

1. Rekombinant-DNA-molekyl, k ä n n e t e c k n a d därav,
att den omfattar en häst-interferon- γ kodande sekvens:

5

R¹ TAC TGC CAG GCT GCT TTC TTT AAA GAA ATC GAA AAC CTG AAA
GAA TAC TTC AAC GCT CGT AAC CCA GAC GTT GGT GAC GGT GGT CCG
CTG TTC CTG GAC ATC CTG AAA AAC TGG AAA GAA GAC TCT GAC AAA
AAG ATC ATC CAG TCT CAG ATC GTT TCT TTC TAC TTC AAA CTG TTC
10 GAA AAC CTG AAA GAC AAC CAG GTT ATC CAG AAA TCG ATG GAC ACT
ATC AAA GAA GAT CTG TTC GTT AAA TTC TTC AAC TCG TCG ACT TCT
AAA CTG GAA GAC TTC CAG AAA CTG ATC CAG ATC CCA GTT AAC GAC
CTG AAA GTT CAG CGT AAG GCT ATC TCT GAA CTG ATC AAA GTT ATG
AAC GAC CTG TCT CCA AAA GCT AAC CTG CGT AAA CGT AAA CGT TCT
15 CAG AAG CCA TTC CGT GGT CGT CGT GCT CTT CAG TAA

eller

R² GCT GCT TTC TTT AAA GAA ATC GAA AAC CTG AAA GAA TAC TTC
20 AAC GCT CGT AAC CCA GAC GTT GGT GAC GGT GGT CCG CTG TTC CTG
GAC ATC CTG AAA AAC TGG AAA GAA GAC TCT GAC AAA AAG ATC ATC
CAG TCT CAG ATC GTT TCT TTC TAC TTC AAA CTG TTC GAA AAC CTG
AAA GAC AAC CAG GTT ATC CAG AAA TCG ATG GAC ACT ATC AAA GAA
GAT CTG TTC GTT AAA TTC TTC AAC TCG TCG ACT TCT AAA CTG GAA
25 GAC TTC CAG AAA CTG ATC CAG ATC CCA GTT AAC GAC CTG AAA GTT
CAG CGT AAG GCT ATC TCT GAA CTG ATC AAA GTT ATG AAC GAC CTG
TCT CCA AAA GCT AAC CTG CGT AAA CGT AAA CGT TCT CAG AAC CCA
TTC CGT GGT CGT CGT GCT CTT CAG TAA

30 varvid R¹ är

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

35 ATG TAT eller

TAT,

R²

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

ATG CAG eller

10 CAG.

2. Rekombinant-DNA-molekyl, k ä n n e t e c k n a d därav,
att den hybridiseras med någon molekyl enligt patentkravet 1
i förhållanden 6xSSC/5x Denhardt's lösning/0,1 % SDS vid
15 65°C (85 % homologi) eller 0,1xSSC/0,01 % SDS/65°C (90 % ho-
mologi), varvid denna DNA-molekyl kan vara av syntetisk el-
ler halvsyntetiskt ursprung och som kodar en polypeptid med
den biologiska och immunologiska aktiviteten hos EqIFN-γ.

20 3. Rekombinant-DNA-molekyl, k ä n n e t e c k n a d därav,
att den en DNA-molekyl enligt patentkravet 1 eller 2.

4. Rekombinant-DNA-molekyl enligt patentkravet 1, k ä n -
n e t e c k n a d därav, att den erhållna DNA-molekylen
25 funktionellt ansluter sig till expressionens kontrollsekvens
och att den är replikerbar i prokaryoter, särskilt E.coli-
bakterier.

5. Escherichia coli-bakterie, k ä n n e t e c k n a d där-
30 av, att den är transformerad med en rekombinant-DNA-molekyl
enligt patentkravet 3 eller 4, varvid den företrädesvis ut-
görs av E.coli JM101 eller HB101.

6. Förfarande för att framställa EqIFN-γ, k ä n n e t e c -
35 k n a t därav, att

- a) Escherichia coli-bakterie transformerar med en DNA-molekyl enligt patentkravet 1 - 4,
- b) de transformerade bakterierna kultiveras i ett lämpligt
5 kultiveringssubstrat och
- c) nämnda polypeptid isoleras.

EqIFN-gamma (Lambda Eq- 2 BamHI-fragmentti)

GGATC 5
 CCACAAGAATGGCACGGGTGGGCATAATGGGTCTGTCTCATCGTCAAAAGACCCAAGGAG 65
 TTGAAAGGAACTCTAACTACAACACCAAAATGCCACAAAACCATAGTTATTAATACAAA 125
 CTAACCTAGCATCTGTGCCTATCTGTCAACCATCTCATCTGAAAAAACTTGTGAAAATACGT 185
 AATCCTGATGAGACTTCAATTAGGTATAAAAACCAGCCCCAGAAGGCGAGGCAGTACACT 245
 CTTCTGATCGCCGGTAGGGCAGCTATTAGAAAAGAAAGATCAGCTGAGGCCTTGGGACCT 305
 GATCAGCTTAGTACAGAAGTGACTGCTTCAACTACTTAGGCCTAACTCTCTCCGAAACA 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 I 1

TTGTGGTTGAAATGACTGAACGTTGTCTTGGAGTTGGATCTCTGATAGGCTGTCCTCTCT 567
 ACTCCACAGTCATCTTGAGAAGACTGGGTGTTATTTCTCTGTTTGTGACTGGATGAGT 627
 TTTTCTTTTTTTTACTAAATGATCTAGATATTGCTTTAACCCTCTGCTCAATTTGCTATA 687
 GAGACTTAGAGAGGGTTCATGAATCTTCCAAAAGATGGGCTTAACAGGTTTATAAAGCAT 747
 AGTGAAGTTGACAATTTTGTGGTGAGAAGCCACTGAATTGTGATAAGTCAAGTAGTGTGG 807
 ACATTGAAAAAATGACTAGCTATTAGTTTCTAACTTCTCAGGTTACTATGATGGTGACAA 867
 TAAAAGGTCAAGATTAGCATTAATAATGGTAATCTGAAATAATTGATCAGTTAAAGAAGGC 927
 GCTGTCCTGAAAGGTTTGGCTGAAAAAAAATCACTTTCAGGTGTTTTCCTCCAAAAAATG 987
 ATTTTAAAAATCTTACTGCCCCGTTTGTGTTAGCTGTGAAGTACTCTGGAACCTCAGTCAAT 1047
 TGCTGAGATTTTGTACGAGTTATAAGCTGGCTTATATTTAAAAAATTTTTTGTGTTTTGT 1107
 TTTATGAGTTTCTTTTAAAAATGTTATTTATGGTTAATTAAAAATAGTTTTTGCATTTTAA 1167
 TATTTTATTATTTGTCCAAAATTTAGCTATTTTAAATTATAGTTGGAGCTCTCTTTTAGAG 1227
 CTGACATAAGACCATAGGGGAGGCACAGATAGATGTGATGGAGCCCTGTACCAGACGGGG 1287
 GCAGTATCTTATAGTGGGTTCCTTTGCTGATCTTTTACTAGACTTGAAATTATTGCT 1347
 TTTCCCTTCCTATGGTTATTTGGGACTATTGAAGTATCACCAGCCCTGTTGAGTTCATCTG 1407
 TAATATTGTAATTCAAGGGTTACACTAGAAAATAAGAAAGCTAAAACAGCAGATAATCT 1467
 TTGGCTACATCCAACACAATAGCTTTTGGGAATACTTATTGTTAGAACTAAACAGAGGGT 1527
 TGAAAAGAAAATCAGTGAATACTGTGAGTCAATAAAACGTGAAGTACATTT 1587

20
 Asn Ala
 TTAGGGCAATTCATGGACTAATTGTAAACCAAGTTTTCCTTCCTTTTTTCAG 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

40															I N T R O N I 2												
Leu	Lys	Asn	Trp	Lys	Glu																						
TTG	AAG	AAC	TGG	AAA	GAG	GTAAGCTAAGTATTTCCATTTGGTTGATTTTCCTGT																					1743
TGCTTATTTTCTGGTGGATGAATTCACACCAACCTCTCTTTGTGCTCTTTTCTCCCTAG																											1802
45															50												
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												
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												
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												
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 I

Pro																											
CCG	GTGAGGAGATCTTAATTCTTTCTTTGGTTTCATTACAGAGGTTCTTGCAAAGTGCT																										2041
TACGTCCCAGAAAGTAGAAATGAACTATGAAATGAACCCGTGGCCAAAACCTCCTCTTCC																											2101
TAATTCATTTGTGCTTTGAGAGACTTTGCTAAGTCAGTATGGGAATCATTAAATTTGT																											2161
GATTTGGGGAAATGCTGGCACTATGACTACTGCACAAAGGCAGGTGAAGGGACAAATCCA																											2221
GTGAGGAGGGGGCAGTGAAGAAGTGGAGGGGAGTCTGGAGAAGCAGGTCTCTCCTTGCCC																											2281
CTTGTTTCGTGAGATGAANTCCTCCTGCTTTGGATGGGAGGCTGCGTGTCTTGGTGGAAG																											2341
AGCAGTGGGAGGAGGGAGAAGATTTGTGCTCCTCCCAGCTCAGCCACCAAGAAACTGTGA																											2401
CCTCAGATGAATCACAGGCCTGGCTGGGGCTCAGTTTCCTCATCTTAAAGAGGCCTATT																											2461
GGGTTCACATAAAATTTCTATGATCTTCTTTGCTCTATAATCCTACAATTCTGTGGACAGA																											2521
AAATGAAATGAGGTAGGAGAAAGAAATAGCCTTTGAAGAGGTTCTTGGGCATTCCACTGC																											2581
CAGGCTCTGGTCAACCTTCATACTCTGCAGCCCAAGAGAGGCAAGACCATTGTCTGTT																											2641
TTTGGAATGCAAAATAGGCGGCATTTATACCTCACGAAAGAACTGTTCTGTCAACTTTTG																											2701
GATACTGGGCTATCTTGGCTGGAGAAATCCTTAGGCTCCCAAACCTTTCTCTCATGAAATT																											2761
GTCTTGAGTCTTTAAATTTATGGCTTCTCGAAGCTGAGAGATAACTTTAAGCATAAAGAC																											2821
AAATTACATTTTCCAACATTTTGTCTAAGAGACAAAGACCTCCACATGCCTTTGGGTTTG																											2881
GCCTGGATCTAAATGGGCTTGAATGAGAAGGGGAGGGTGTGTTATGACTATGTTTAGAA																											2941
GAGAAAACAGAGGTTTGGAGAGGTTAAGTGGCTGGTTCAAAGTCAGAGTTATTGCACACA																											3001
CAGGATTCGAACCCATATGTTTTGTCCCTCCACTTTAGGGTTCTTTTCGCTACATAATTT																											3061
TGAGAATTCTGTACCAGTCAATTTAAGGATGTGTGATGTTCCCCATCCTATTACAGCACA																											3121
ACCAGCAATTTAATTATAATTTTAGTCTTAAGTCTGAAGAAAGCAGCATTACATATTAA																											3181
GCTAACATATTCTGTGAAAGCAACTTTTCAAAGGAATATTTCTATTTTTCATGGACCA																											3241
TGACAGTAGCACAGCCTGATGGCTTGATGCCTGAAACTAATTTTGCTGTTTTCTTTCCC																											3301

105															110												
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												
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

Fig. 1b

	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 TGGTCATCCTGCCTGCAATATTTGAATTTTAAATCTAAATCTATTTATTAATATT	3497
TAATATTTTACATTATTTATATGGGGAATATATTTTAAACTCATCAAAGTATTTATAAT	3557
AGCAACTTTTATGTAATGAAAATGGGTATCTATTAATATATATATTATTTATAATTCCTG	3617
TATGGTGTGACTATTTCACTTGACCCTTTTTTTCTGACCAACTAGGCAAGATTATGTGA	3677
TTACAAGGCTTTAACTCAGGGGGCCAAGTAGGGAGTGGGTAGCCGACCTACCAAGACCCTG	3737
TGAGCTGTGTGTTTATTTCCCTCAATGATACAAATGAACACTTATAAAGGAAAGGAGGGCC	3797
TCCAGTCACTGCCTGTTGGAGAACATGTCTGCATTGTGAGCCACTGCTTAATGGCATGTC	3857
AAACCACGCTTGAATGTGTCAGATGATAGGGCTTGTCCCCTGATAAAGCTTAGTATCTCC	3917
TCTCATGCCTAGTGCTTCAGAAATATTGTTGACAACCTGTGACTGCACCCAAATGGAAAGTA	3977
ATTTATTTGTTTAGTTTACCAATATTTAATAAAATATGAATAAAGTATAATTTCATAACTA	4037
TTTATGCTGCGTCCGGCTTTTTCTAAGTGAGGACTGGGGTAAATGAACTACAAACTAATG	4097
AATCAGTAAGAGGGAACTCGTTTTTAGCGGTGGAAATCTTAGCTGGATTAAGCCCCATGA	4157
AACGTGGTATTTCTCTCCACTGGAGATTTGTTGGCTACTACTCCTCCATGTAGCAGCTCT	4217
TTATCTTTCCAAAATATAAATTTAATTATGTCACCATTTACTTCAGAGCTTCTGCGATGG	4277
AAAGTAGTTCAAATAGTTTAGCTTAGCACACAAAGCTTTGTTTCTCCCTCCTCCCTCAAC	4337
TCTGCACTGTGCTCTTCATCTTGGTGTCCCCACGTCCTCTGTCCACTTCGGGCAAACCAC	4397
CGGGAATGTCATGGTGGAGGGTGGAGCTCTAGGGAGAGAGGGCTGGATTAGAATTTTCGGCCC	4457
CACCATTACCAGTAGTATGACCTTTAATGAATTACTTGTATTCTCTAAGCTCCAGTTTCC	4517
TCATCTGACACAAGAGAATAATTGTGCCTAAAATTGTGGTGAGAGTTTGTTCCTTCACTC	4577
AAGAAGTGTTTACTGGAGCATCCACTAGTTGCCTAGTGCTGTTCTAGGCACTTGAGATAC	4637
ATTTGTGAACAAAATAGTCAAGGATCC	4664

Fig. 1c

	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	
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
	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
	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
	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
	AGC	TAC	CTG	TGA	TAG	TTT	CTT	CTA	GAC	AAG	CAA	TTT	AAG	AAG	TTG	AGC	AGC	TGA
	(8)																	
	(10)																	
	ClaI																	
	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
	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
	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
	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													
	CGA	GAA	GTC	ATT	CCTAG													
	(14)																	
	BamHI																	
	442																	
	446																	

Fig. 3

```

      1                                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

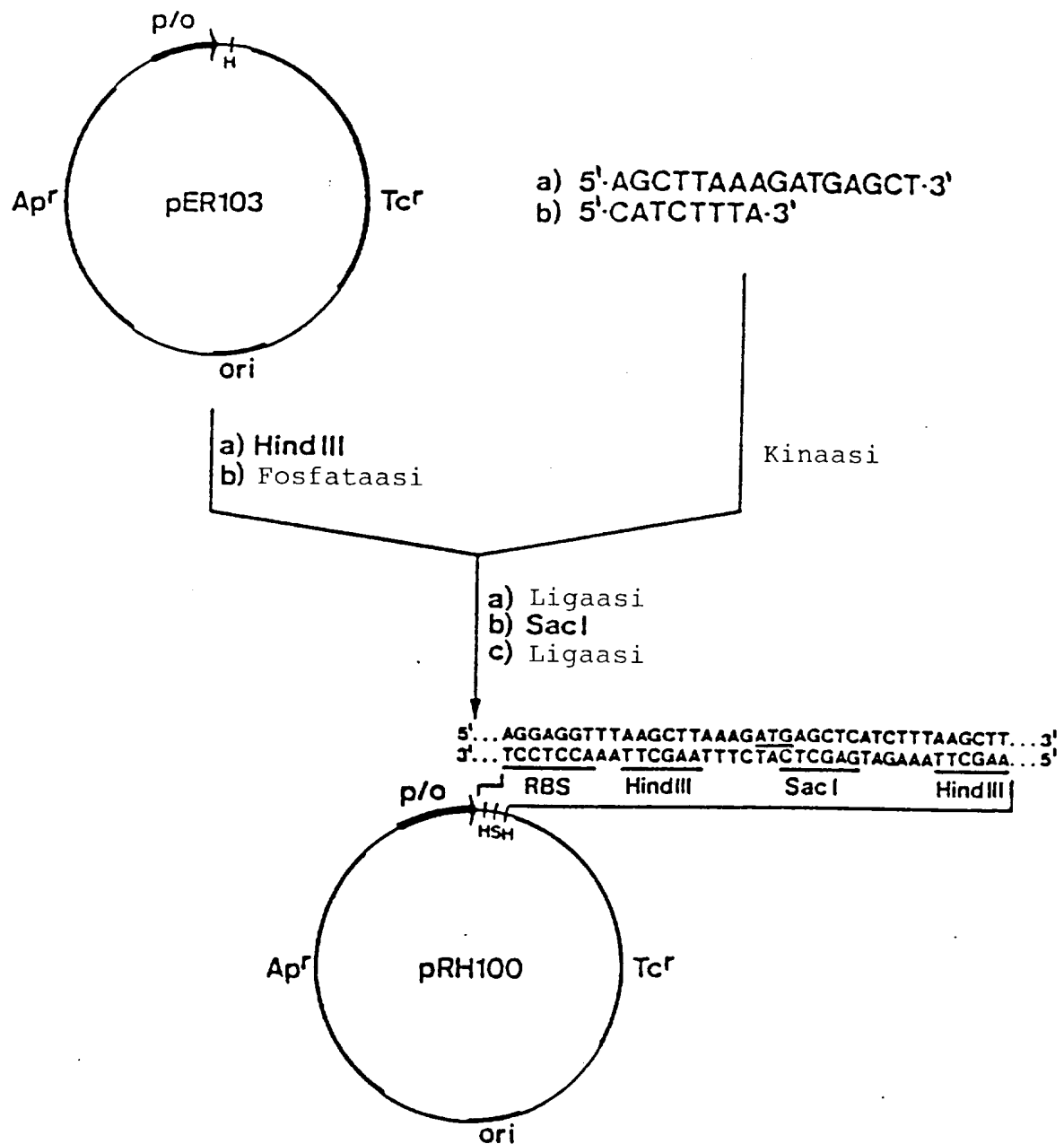
```

Fig. 4

Valmiin EqIFN-gamman kolonnien käyttö: luonnon mukainen geeni
(synteettinen geeni)

	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)	H1s	0	(8)	Arg	T
	2	(0)	Leu	1	(0)	Pro	0	(0)	H1s	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: Ampisilliini-resistantti geeni

Tc^r: Tetrasykliini-resistantti geeni

ori: replikointi-alkuperä

RBS: ribosomi-sidoskohta

p/o: tryptofaani-promoottori/operaattori

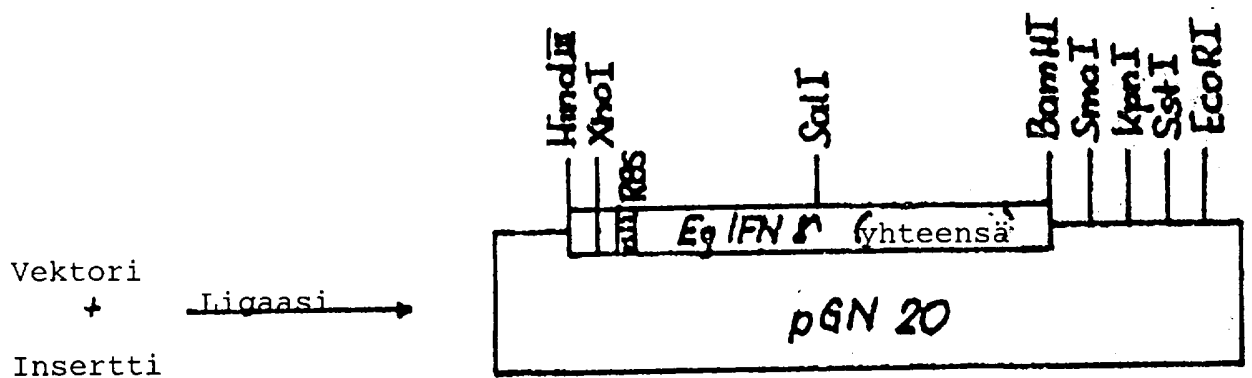
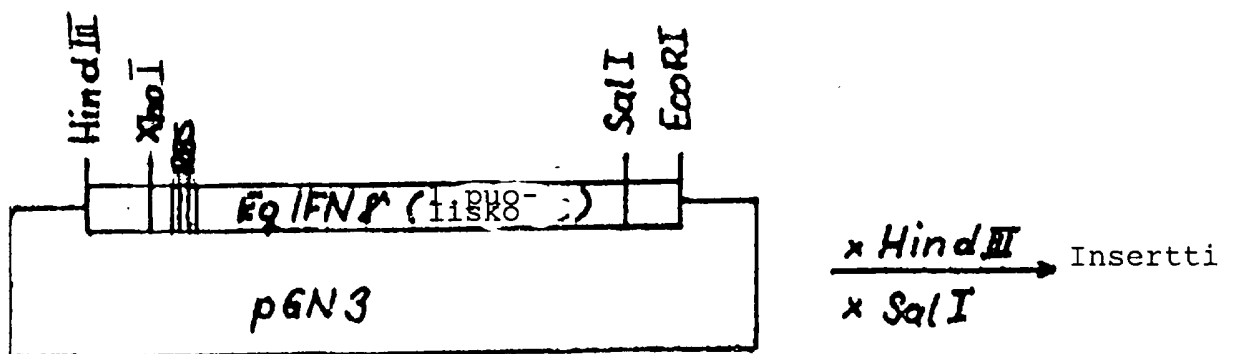
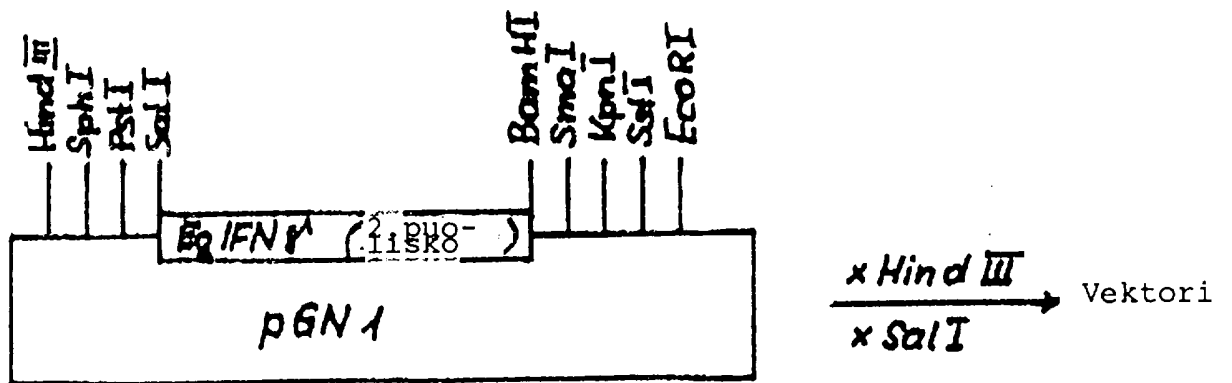


Fig. 7