

(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT



Ausschliessungspatent

Erteilt gemä § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

210 304

Int.Cl.³

3(51) C 12 N 15/00

AMT FUER ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veroeffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2552 997
(31) 256204;164.986
184.909;205.578

(22) 01.07.81
(32) 21.04.81;01.07.80
08.09.80;10.11.80

(44) 06.06.84
(33) US;US
US;US
US

(71) siehe (73)
(72) NORMAN GOEDDEL, DAVID VAN;PESTKA, SIDNEY;US;
(73) F. HOFFMANN LA ROCHE U. CO AG, BASEL, CH; GENENTECH, INC., SOUTH SAN FRANCISCO, US

(54) VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES REPLIKABLEN VEKTORS

(57) Die Erfindung betrifft ein gentechnisches Verfahren zur Herstellung von Leukozyten-Interferon, was auch Ziel der Erfindung ist. Erfindungsaufgabe ist es, ein Verfahren zur Herstellung eines replikablen Vektors, der in einem Mikroorganismus die Expression eines Polypeptids mit der Aminosäuresequenz eines reifen Human-Leukozyten-Interferons bewirkt, bereitzustellen. Erfindungsgemä verbindet man eine dieses Polypeptid codierende erste DNS-Sequenz operabel mit einer zweiten DNS-Sequenz, die die für die Expression notwendigen Codons enthält.

Berlin, den 9.12.1983

62 991/12/37

Ausscheidung II aus

AP C 12 K/231 371

59 477/12

Verfahren zur Herstellung eines replikablen Vektors

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der rekombinanten DNS-Technologie, d. h. Verfahren, die auf diesem Gebiet verwendet werden und Produkte, die mit diesen Verfahren erhalten werden.

Genauer gesagt, betrifft die vorliegende Erfindung Polypeptide, insbesondere die Herstellung reifer Human-Leukozyten-Interferone.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Human-Leukozyten-Interferon (LeIF) wurde zuerst von Isaacs and Lindenmann (Proc. R. Soc. B 147, 258-267 (1957); U. S. P. 3.699.222) entdeckt und in Form der rohen Präzipitate hergestellt. Die seit dieser Zeit andauernden Anstrengungen, das Material zu reinigen und zu charakterisieren, haben zur Herstellung relativ homogener Leukozyten-Interferone aus normalen Leukozyten oder aus Leukozyten von leukämischen Spendern geführt (z. B. Deutsche Offenlegungsschrift Nr. 2.947.134). Diese Interferone gehören zu einer Familie von Proteinen, die die bekannte Eigenschaft besitzen, bestimmten Zellen einen Virus-resistenten Zustand zu verleihen. Darüber hinaus kann Interferon die Zell-Proliferation hemmen und die Immunantwort modulieren. Diese Eigenschaften haben dazu geführt, daß Leukozyten-Interferon klinisch als therapeutisches Mittel zur Behandlung viraler Infektionen und Krankheiten eingesetzt wurde.

In der Vergangenheit wurde Leukozyten-Interferone im wesentlichen bis zur Homogenität gereinigt (Rubinstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 640-644 (1979); Zoon et al., ibid. 76, 5601-5605 (1979)). Die berichteten Molekulargewichte liegen im Bereich von etwa 17.500 bis etwa 21.000. Die spezifischen Aktivitäten dieser Präparate sind bemerkenswert hoch mit 2×10^8 bis 1×10^9 Einheiten pro mg Protein, aber die aus den Zellkulturen erhaltenen Ausbeuten sind bisher entmutigend niedrig. Trotzdem gelang durch verfeinerte Proteinsequenzierungsmethoden die Bestimmung von Aminosäurepartialsequenzen (Zoon et al, Science 207, 527 (1980); Levy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 77, 5102-5104 (1980)). Die Frage der Glycosylierung der verschiedenen Leukozyten-Interferone ist bis jetzt noch nicht völlig abgeklärt, aber es ist soviel klar, daß Unterschiede in den Molekulargewichten nicht allein durch Glycosylierung hervorgerufen werden. Es ist auch klar, daß die Leukozyten-Interferone deutlich unterschieden sind voneinander durch unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung und -sequenz und die Aminosäurehomologie ist in manchen Fällen niedriger als 80 %.

Während das aus Spender-Leukozyten isolierte homogene Leukozyten-Interferon ausreichte zur partiellen Charakterisierung und zu limitierten klinischen Studien, reicht diese Quelle bei weitem nicht aus für die Gewinnung derjenigen Mengen an Interferon, die für breite klinische Prüfungen und die anschließende prophylaktische und/oder therapeutische Verwendung notwendig sein werden. Tatsächlich bediente man sich bei den bisherigen klinischen Untersuchungen zur Evaluation des Human-Leukozyten-Interferons in Antitumor- und antiviralen Testen hauptsächlich rohen Materials (Reinheit < 1 %) und die langen Zeiten, die nötig sind, um genügende Mengen reinen Materials zu erhalten haben zu

einer starken Verzögerung von Untersuchungen in größerem Maßstab geführt.

Durch rekombinante DNS-Technologie ist es jedoch inzwischen gelungen, eine große Anzahl wertvoller Polypeptide kontrolliert mikrobiell herzustellen. So existieren inzwischen bereits Bakterien, die durch diese Technologie so modifiziert wurden, daß sie die Herstellung von Polypeptiden wie Somatostatin, den A und B Ketten des Human-Insulins und Human-Wachstumshormon gestatten (Itakura et al., Science 198, 1056-1063 (1977); Goeddel et al., Nature 281, 544-548 (1979)). Kürzlich gelang durch die Anwendung der rekombinanten DNS-Technik die bakterielle Herstellung von Proinsulin und Thymosin alpha 1 und verschiedene Autoren haben berichtet, daß es ihnen gelungen ist, Human-Leukozyten-Interferon kodierende DNS und entsprechende Proteine mit Leukozyten-Interferonaktivität zu erhalten (Nagata et al., Nature 284, 316-320 (1980); Mantei et al., Gene 10, 1-10 (1980); Taniguchi et al., Nature 285, 547-549 (1980)).

Das Zugpferd der rekombinanten DNS-Technologie ist das Plasmid, eine nicht-chromosomale Schleife doppelsträngiger DNS, die in Bakterien und anderen Mikroben oft in vielen Kopien pro Zelle vorliegt. Die in der Plasmid-DNS enthaltene Information umfaßt diejenige zur Reproduktion des Plasmids in Tochterzellen (d. h. ein "Replicon") und gewöhnlich ein oder mehrere Selektions-Charakteristiken wie, im Fall von Bakterien, die Resistenz gegenüber Antibiotika, die es erlauben, Klone der Wirts-Zelle, die das interessierende Plasmid enthalten, zu erkennen und in einem ausgewählten Medium selektiv zu züchten. Die Nützlichkeit der Plasmide liegt in der Tatsache, daß sie spezifisch durch die eine oder andere Restriktions-Endonuclease (auch

Restriktionsenzym genannt) gespalten werden können, wobei jede Endonuclease eine andere Stelle der Plasmid-DNS erkennt. Heterologe Gene oder Genfragmente können in das Plasmid an den Spaltstellen oder anschließend an die Spaltstellen rekonstruierte Enden eingefügt werden. Die DNS-Rekombination wird außerhalb der Zelle durchgeführt aber das erhaltene rekombinante Plasmid wird durch einen Vorgang, der als Transformation bekannt ist, in die Zelle eingeführt und große Mengen an heterologe Gene enthaltenden, rekombinierten Plasmiden können durch Kultivierung der transformierten Zellen erhalten werden. Ist das heterologe Gen in richtiger Weise (d. h. operabel) bezüglich derjenigen Teile des Plasmids eingefügt, die für die Transcription und Translation der kodierten DNS-Nachricht verantwortlich sind, dann kann das erhaltene rekombinierte Plasmid (Expressionsvektor, Vektor) zur Herstellung des Polypeptids verwendet werden, daß durch das heterologe Gen kodiert wird. Dieser Prozeß wird als Expression bezeichnet.

Die Expression wird ausgelöst in der Promoter-Region, die durch RNS-Polymerase erkannt und gebunden wird. In einigen Fällen, wie z. B. beim Tryptophan- oder "trp"-Promoter, der in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bevorzugt ist, werden Promotor-Regionen von sogenannten Operator-Regionen überlappt und bilden dann einen kombinierten Promotor-Operator. Operatoren sind DNS-Sequenzen, die von sogenannten Repressor-Proteinen erkannt werden, die wiederum die Frequenz des Transkriptionsbeginns an einem speziellen Promotor regulieren. Die Polymerase wandert an der DNS entlang und überschreibt die Information, die der kodierende Strang enthält, vom 5' - zum 3'-Ende in

mRNS, die dann wiederum in das Polypeptid mit der durch die DNS kodierten Aminosäuresequenz übersetzt wird. Jede Aminosäure eines Polypeptids wird innerhalb des sogenannten Strukturgens durch ein Nukleotid-Triplett oder Codon kodiert. Nach der Bindung an den Promotor transkribiert die RNS-Polymerase zunächst Nukleotide, die eine Ribosomen-Bindungsstelle kodieren, dann ein Translations-Startsignal (gewöhnlich ATG, das in der mRNS zu AUG wird) und schließlich die Nukleotid Sequenzen des Strukturgens selbst. Am Ende des Strukturgens werden sogenannte Stopcodons transkribiert, nach denen die Polymerase noch weitere mRNS-Sequenzen bilden kann, die aber wegen des vorhandenen Stoppsignals von den Ribosomen nicht mehr übersetzt werden. Die Ribosomen lagern sich an die vorgesehene Bindungsstelle der mRNS an, in Bakterien gewöhnlich während diese entsteht, und stellen dann ihrerseits das kodierte Polypeptid her, beginnend am Translations-Startsignal und endend mit dem bereits erwähnten Stoppsignal. Das gewünschte Produkt wird hergestellt, wenn die Sequenzen, die die Ribosomen-Bindungsstelle kodieren richtig liegen in Bezug auf das AUG-Startsignal und wenn alle übrigen Kodons mit dem Startsignal in Phase sind. Das gewünschte Polypeptid kann erhalten werden durch Lyse der Wirts-Zelle, Abtrennung von anderen Bakterienproteinen und Reinigung in üblicher Weise.

Der vorliegenden Erfindung lag der Gedanke zugrunde, daß die Anwendung der rekombinanten DNS-Technologie (d. h. die Erfindung von Interferongenen in mikrobielle Vektoren und deren Expression unter der Kontrolle mikrobieller genregulatorischer Elemente) der wirkungsvollste Weg zur Gewinnung großer Mengen Leukozyten-Interferon wäre, welches trotz der Tatsache, daß es nicht glykosyliert ist, wie vielleicht das natürliche, zur klinischen Behand-

lung vieler viraler und neoplastischer Erkrankungen verwendet werden könnte.

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, Leukozyten-Interferon unter Einsatz der Gentechnik herzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines replikablen Vektors bereitzustellen, der in einem Mikroorganismus die Expression eines Polypeptids mit der Aminosäuresequenz eines reifen Human-Leukozyten-Interferone bewirkt.

Ein erstes Leukozyten-Interferon-Gen wurde erfindungsgemäß durch die folgenden Maßnahmen erhalten:

(1) Aminosäurepartialsequenzen von homogenem Humanleukozyten-Interferon wurden verwendet, um synthetische DNS-Sonden zu konstruieren, deren Codons insgesamt aller möglichen Nucleotidkombinationen repräsentierten, durch die die Aminosäurepartialsequenzen kodiert werden können.

(2) Es wurden Bänke von Bakterienkolonien hergestellt, die komplementäre DNS (cDNS) aus induzierter mRNA enthielten. Andere induzierte und radioaktiv markierte mRNA wurde mit Plasmid-cDNS aus dieser Bank hybridisiert. Hybridisierende mRNA wurde eluiert und auf Translation in Interferon im Oozyten-Test getestet. Plasmid-DNS aus Kolonien, die in diesem Test Interferonaktivität besaßen, wurden ferner auf Hybridisierung mit Sonden, die nach (1) erhalten wurden, getestet.

(3) Parallel zu dem Vorgehen unter (2) wurde mittels induzierter mRNS erhaltene cDNS in Plasmiden dazu verwendet, eine unabhängige Bank transformierter Kolonien zu bilden. Die gemäß (1) erhaltenen Sonden wurden als Starter für die Synthese radiomarkierter einsträngiger cDNS verwendet, die wiederum als Hybridisierungssonden benutzt wurden. Die synthetischen Sonden hybridisierten mit induzierter mRNS als Matrize und wurden ferner mittels reverser Transkription dazu verwendet, induzierte, radiomarkierte cDNS zu bilden. In dieser Weise erhaltene Klone der Koloniebanc, die mit radiomarkierter cDNS hybridisierten, wurden weiterhin untersucht auf das Vorliegen eines Interferon vollständig kodierenden Gens. Jedes gemäß (1) oder (2) erhaltene, möglicherweise eine Teilsequenz des Interferons kodierende Genfragment kann als Sonde für ein ungekürztes Gen verwendet werden.

(4) Das so erhaltene ungekürzte Gen wurde maßgeschneidert unter Verwendung synthetischer DNS, um jegliche Leader-Sequenz, die die mikrobielle Expression des reifen Polypeptids verhindern könnte, auszuschliessen und um es in einem Vektor in die richtige Position bringen zu können bezüglich der Startsignale und der Ribosomenbindungsstelle eines mikrobiellen Promoters. Das experimentierte Interferon wurde soweit gereinigt, daß es charakterisiert und seine Aktivität bestimmt werden konnte.

(5) Das auf diese Weise erhaltene Interferon-Genfragment konnte seinerseits als Sonde für die Isolierung (mittels Hybridisierung) von weiteren Genen für andere, teilweise homologe Leukozyten-Interferone verwendet werden.

Durch die Anwendung der vorstehend kurz beschriebenen Methoden der rekombinanten DNS-Technologie, wurde die

mikrobielle Herstellung der Familie homologer Leukozyten-Interferone (in nicht-glykosylierter Form) als reife Polypeptide, d. h. im wesentlichen frei von entsprechenden Präsequenzen oder Teilen davon, erreicht. Diese Interferone können direkt exprimiert, isoliert und soweit gereinigt werden, daß sie für die Verwendung zur Behandlung viraler und bösartiger Krankheiten von Tieren und Menschen geeignet sind.

Einzelne Glieder der Interferon-Familie, soweit sie exprimiert wurden, waren in in vitro-Tests wirksam und, in einem ersten derartigen Versuch, ebenfalls in einem in vivo-Test, wobei es sich bei letzterem um die Prüfung des ersten mikrobiell hergestellten reifen Leukozyten-Interferons handelte.

Der Ausdruck "reifes Leukozyten-Interferon", der im Zusammenhang mit der vorliegenden Anmeldung verwendet wird, definiert ein mikrobiell (z. B. bakteriell) hergestelltes Interferonmolekül, das keine Glykosylgruppen trägt. Reifes Leukozyten-Interferon, gemäß vorliegender Erfindung, wird von einem Translations-Startsignal (ATG) direkt vor dem ersten Aminosäurecodon des natürlichen Produktes exprimiert. Das "reife" Polypeptid kann daher als erste Aminosäure seiner Sequenz Methionin (für das ATG codiert) enthalten, ohne daß damit sein Charakter wesentlich geändert würde. Andererseits kann der mikrobielle Wirt aus dem unmittelbaren Translationsprodukt das Methionin abspalten. Reifes Leukozyten-Interferon kann zusammen mit einem konjugierten Protein, das nicht ein üblicher Leader, ist exprimiert werden, wobei das Konjugat spezifisch intra- oder extrazellulär gespalten werden kann (vergleiche britische Patentanmeldung Nr. 2007676 A). Schließlich kann das reife

Interferon zusammen mit einem mikrobiellen "Signal-Peptid" hergestellt werden, das das Konjugat an die Zellwand transportiert, wo die Signalsequenz abgespalten und das reife Polypeptid sezerniert wird. Expression von reifem Leukozyten-Interferon bedeutet bakterielle oder andere mikrobielle Herstellung eines Interferonmoleküls, das weder Glykosylgruppen noch eine Präsequenz enthält.

Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Leukozyten-Interferone (Figuren 4 und 9) wurden auf Grund der DNS-Sequenzen der entsprechenden Gene (Figuren 3 und 8) ermittelt. Für alle diese einzelnen Leukozyten-Interferone existieren natürliche, von Individuum zu Individuum unterschiedliche allelische Varianten. Diese Varianten können gekennzeichnet sein durch Austausch (Substitution, Inversion), Deletion oder Insertion einzelner oder mehrerer Aminosäuren in der Sequenz. Derartige allelische Variationen der erfindungsgemäßen Leukozyten-Interferone A bis J sind von den jeweiligen Formeln (LeIF A bis LeIF J) mitumfaßt und ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Beschreibung der Figuren

Figur 1 beschreibt zwei Aminosäurepartialsequenzen, die allen Interferonspezies, die aus menschlichen Leukozyten isoliert und bis zur Homogenität gereinigt wurden, gemeinsam sind. Sie sind T-1 und T-13 bezeichnet. Es sind alle möglichen mRNS-Sequenzen, die diese Peptide kodieren, dargestellt, ebenso wie die entsprechenden cDNS-Sequenzen. Die Buchstaben A, T, G, C und U bezeichnen die Nucleotide mit den Basen Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin und Uracil. Der Buchstabe N bedeutet A, G, C oder U. Die Polynucleotide

sind vom 5'-Ende (links) zum 3'-Ende (rechts) angegeben und wo sie doppelsträngig dargestellt sind, ist die untere DNS (nicht-kodierender Strang) von 3'- in 5'-Richtung wiedergegeben.

Figur 2 stellt ein Autoradiogramm dar, das die Hybridisierung von möglichen LeIF-Plasmiden mit ^{32}P -markierten synthetischen Deoxyoligonukleotiden zeigt.

Figur 3 gibt die Nukleotidsequenzen (kodierende Stränge) von acht isolierten Genfragmenten (bezeichnet A-H) wieder, die für die Expression von Leukozyten-Interferonen verwendet werden können. Der ATG Translations-Start-Codon und die Stoptripletts für jedes LeIF sind unterstrichen. Auf die Stoptripletts folgen unübersetzte Sequenzen. Dem vollständigen Gen für LeIF A fehlt ein Codon in der Position 200 bis 202, der bei den anderen LeIFs vorhanden ist. Vor der Leader-Sequenz liegen ebenfalls unübersetzte Sequenzen. Dem isolierten Fragment E fehlt die volle Leader-Präsequenz, aber es enthält das vollständige Gen für ein etwaiges reifes LeIF E. Dem isolierten Fragment G hingegen fehlt ein Teil der kodierenden Sequenz.

Figur 4 gibt einen Überblick über die aus den bestimmten Nukleotidsequenzen abgeleiteten Aminosäuresequenzen von 8 Leukozyten-Interferonen (A bis H). Die für die Bezeichnung der einzelnen Aminosäuren verwendeten großen Buchstaben sind die von der IUPAC-IUB Kommission für biochemische Nomenklatur empfohlenen. Es bedeuten: A Alanin; C Cystein; D Asparaginsäure; E Glutaminsäure; F Phenylalanin; G Glycin; H Histidin; I Isoleucin; K Lysin; L Leucin; M Methionin; N Asparagin; P Prolin; Q Glutamin; R Arginin; S Serin; T Threonin; V Valin; W Tryptophan; und Y Tyrosin. Die Zahlen geben die Position

der Aminosäuren an (S bezieht sich auf das Signal-Peptid). Der Bindestrich in der 165 Aminosäuren umfassenden Sequenz von LeIF A in Position 44 wurde eingeführt, um die Sequenz des LeIF A in Übereinstimmung mit den 166 Aminosäuren der anderen Leukozyten-Interferone zu bringen. Für die Festlegung der Aminosäuresequenz des LeIF E wurde das Nukleotid in Position 187 (Figur 3) nicht berücksichtigt. Die Sterne (Sequenz von LeIF E) stellen in-Phase-befindliche Stopcodons dar. Aminosäuren, die allen LeIFs (mit Ausnahme des Pseudogens LeIF E) gemeinsam sind, sind in Zeile "All" dargestellt. Die unterstrichenen Reste sind Aminosäuren, die auch im Human-Fibroblasten-Interferon vorkommen.

Figur 5 gibt die Restriktionsendonuclease-Karten der klonierten cDNSs von 8 verschiedenen Leukozyten-Interferonen wieder (A bis H). Die hybriden Plasmide wurden nach der dC:dG-Tailing-Methode (Goeddel, D.V. et al, Nature 287, 411-416 (1980) hergestellt. Die cDNS-Einsätze können daher mit PstI herausgeschnitten werden. Die Linien an den Enden jedes cDNS-Einsatzes stellen die anschliessenden homopolymeren dC:dG-Schwänze dar. Die Lage der PvuII-, EcoRI- und BglII-Restriktionsstellen sind angegeben. Schattierte Regionen in der Figur stellen kodierende Sequenzen für reife LeIFs dar; die schräg-gestrichelten Regionen bezeichnen kodierende Sequenzen für Signalpeptide, während die weißen Regionen nicht-kodierende Sequenzen darstellen.

In Figur 6 wird schematisch die Konstruktion eines Gens, das die direkte mikrobielle Synthese von reifem LeIF A kodiert, dargestellt. Es werden die Restriktionsstellen (PstI, usw.) sowie die verwendeten Bruchstücke gezeigt. Die Abkürzung "b.p." bedeutet Basenpaare.

Figur 7 (nicht maßstabgerecht) stellt schematisch die Restriktions-Karte von 2 Genfragmenten dar, die zur Expression von reifem LeIF B verwendet wurden. Die bezeichneten Nukleotid-Codons sind die Enden der kodierenden Stränge, die durch Behandlung mit dem Restriktionsenzym Sau3a in den beiden dargestellten Fällen entstehen.

Die Figuren 8 und 9 geben die DNS- und Aminosäuresequenzen der Leukozyten-Interferone A, C, H, I und J wieder. In Figur 9 bedeutet der Stern einen Stopcodon in der entsprechenden DNS-Sequenz, während der Bindestrich in der Sequenz von LeIF A die benachbarten Aminosäuren, Phenylalanin und Glycin miteinander verbindet.

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

Die verwendeten Mikroorganismen

Die beiden folgenden Mikroorganismen wurden verwendet: E. coli x 1776, wie beschrieben in U.S.P. 4.190.495, und E. coli K-12 Stamm 294 (end A, thi⁻, hsr⁻, hsm_K⁺), wie in der britischen Patentanmeldung Nr. 2055382 A beschrieben. Beide Organismen wurden bei der American Type Culture Collection deponiert unter den ATCC Nrr. 31537 und 31446. Die gesamte Arbeit wurde unter Beachtung der Richtlinien des National Institute of Health durchgeführt.

Außer den beiden oben genannten E. coli-Stämmen können aber auch andere Stämme, beispielsweise E. coli B oder weitere Mikroben-Stämme, verwendet werden, von denen die meisten an einem Depositorium, wie der American Type Culture Collection, hinterlegt worden sind und allgemein zugänglich sind. Vergleiche auch Deutsche Offenlegungsschrift 2644432. Weitere Mikroorganismen, die erfindungs-

gemäß verwendet werden können, sind z. B. Bacilli, wie *Bacillus subtilis* und andere Enterobacteriaceae, unter denen vor allem *Salmonella typhimurium* und *Serratia marcescens* zu nennen wären, die unter Verwendung von replikablen Plasmiden heterologe Gene zur Expression bringen können. Auch in Hefen, beispielsweise in *Saccharomyces cerevisiae*, können Interferongene zur Expression gebracht werden unter der Kontrolle eines Hefepromotors.

B. Quelle und Reinigung von LeIF mRNS

LeIF mRNS kann von Human-Leukozyten (normalerweise von CML-Patienten), die zur Produktion von Interferon mit Sendai-Virus oder NDV, wie beispielsweise in der deutschen Offenlegungsschrift Nr. 2947134 beschrieben, angeregt wurden, erhalten werden. Eine besonders bevorzugte und für die vorliegende Arbeit verwendete Quelle ist eine Zelllinie, die KG-1 bezeichnet ist und sich von einem Patienten mit akuter myelogener Leukämie ableitet. Die Zelllinie, beschrieben von Koeffler, H.P. und Golde, D.W., *Science* 200, 1153 (1978), wächst schnell in einem Medium enthaltend RPMI (Rosewell Park Memorial Institute) 1640 mit 10 % FCS (fötales Kälberserum), hitzeinaktiviert, 25 mM HEPES-Puffer (N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethan-sulfonsäure) und 50 µg/ml Gentamycin. Die Zellen können in dem vorstehend beschriebenen Medium nach Zusatz von 10 % Dimethylsulfoxid eingefroren werden. Die KG-1 Linie ist bei der American Type Culture Collection unter der ATCC Nr. CRL 8031 deponiert worden.

Die KG-1-Zellen wurden nach der von Rubinstein et al. in (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 640-644 (1979) be-

schriebenen Weise mit Sendai-Virus oder NDV zur Produktion von Leukozyten-Interferon-mRNS angeregt. Die Zellen wurden 5 Stunden nach der Induktion geerntet und die mRNS wurde nach der Guanidinthiocyanat-Guanidinhydrochlorid-Methode (Chirgwin et al., Biochemistry 18, 5294-5299 (1979)) hergestellt. RNS aus nicht-indizierten Zellen wurde in der gleichen Weise isoliert. Oligo-deoxythymidin (dT)-Cellulose-Chromatographie und Saccharose-Gradient-Ultrazentrifugation wurden benutzt, um die 12S Fraktion von Poly(A)-mRNS, wie von Green et al. (Arch. Biochem. Biophys. 172, 74-89 (1976)) und Okuyama et al. (Arch. Biochem. Biophys. 188, 98-104 (1989)) beschrieben, zu erhalten. Diese mRNS hatte einen Interferontiter von 8000-10.000 Einheiten pro Microgramm im *Xenopus laevis* Oozytentest (Cavalieri et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 3287-3291 (1977)).

C. Herstellung von Koloniebänken, die LeIF-cDNS-Sequenzen enthalten

5 µg mRNS wurde zur Herstellung doppelsträngiger cDNS nach Standardmethoden (Wickens et al., J. Biol. Chem. 253, 2483-2495 (1978) und Goeddel et al., Nature 281, 544-548 (1979)) verwendet. Die cDNS wurde der Größe nach fraktioniert durch Elektrophorese an einem 6 % Polyacrylamidgel und 230 ng des Materials mit 500-1500 Basenpaaren wurden durch Elektroelution isoliert. 100 ng dieser cDNS wurden mit Deoxycytidin (dC)-Resten nach der von Chang et al. (Nature 275, 617-624 (1978)) beschriebenen Methode verlängert, verbunden mit 470 ng des Plasmids pBR 322, welches mit Deoxyguanosin (dG)-Resten an der PstI-Spaltstelle (Bolivar et al., Gene 2, 95-113 (1977)) verlängert worden war und zur Transformation von *E. coli* x 1776 verwendet. Es wurden etwa 130 Tetracyclin-resistente, Ampicillin-empfindliche Transformanten pro ng cDNS erhalten.

In einem zweiten ähnlichen Experiment wurden etwa 1000 Tetracyclin-resistente, Ampicillin-empfindliche E. coli K-12 Stamm 294-Transformanten pro ng cDNS erhalten. In diesem Falle lag die Größe des fraktionierten cDNS-Materials zwischen 600 und 1300 Basenpaaren. Es wurde durch Elektroelution für die Verlängerung mit Deoxycytidin (dC) gewonnen.

D. Herstellung synthetischer Oligonucleotide und deren Verwendung

Die Kenntnis der Aminosäuresequenzen verschiedener tryptischer Fragmente von humanen Leukozyten-Interferonen erlaubte die Synthese von Deoxyoligonukleotiden, die bestimmten Regionen der LeIF mRNS komplementär waren. Die beiden tryptischen Peptide T1 und T13 wurden ausgewählt, weil ihre Aminosäuresequenzen die Synthese von nur 12 bzw. 4 Undecameren erforderte, um alle möglichen Nucleotidsequenzen zu erfassen (Figur 1). 4 Sätze von Deoxynukleotidsonden wurden für jede Sequenz synthetisiert, die entweder 3 (T-1A, B, C, D) oder ein (T-13A, B, C, D) Oligonucleotid enthielten. Die bezeichneten komplementären Deoxyoligonucleotide aus jeweils 11 Basen wurden chemisch synthetisiert nach der Phosphortriester methode (Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5765-5769 (1978)). In der T-13 Serie wurden 4 individuelle Sonden hergestellt. Die zwölf T-1 Sonden wurden in vier Pools zu 3 Sonden, wie in Figur 1 gezeigt, hergestellt.

Die vier individuellen Sonden der T-13 Serie und die zwölf T-1 Sonden, hergestellt in je vier Gruppen zu 3 Sonden, wurden verwendet, um die Synthese radiomarkierter einsträngiger cDNS zum Gebrauch als Hybridisierungssonden zu starten. Die Matrizen-mRNS war entweder 12S RNS von mit Sendai-Virus induzierten KG-1 Zellen (8000 Einheiten IF-

Aktivität per μg) oder gesamte Poly(A)-mRNS aus nicht induzierten Leukozyten (10 Einheiten pro μg). ^{32}p -markierte cDNS wurde aus diesen Startern hergestellt unter Verwendung bekannter Reaktionsbedingungen (Noyes et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1770-1774 (1979)). Die 60 μl -Reaktionen wurden durchgeführt in 20mM Tris-HCl (pH 8,3), 20mM KCl, 8mM MgCl_2 und 30mM β -Mercaptoethanol, jeweils mit 1 μg jedes Startes (d. h. 12 μg insgesamt für die T-1 Serie, 4 μg insgesamt für die T-13 Serie), 2 μg induzierter 12 S mRNS (oder 10 μg nicht induzierter Poly (A)-mRNS), 0,5 mM dATP, dCTP, dTTP, 200 uCi (α - ^{32}p)dCTP (Amersham, 2-3000 Ci/nmole) und 60 Einheiten reverser Transkriptase (Bethesda Research Laboratories). Das Produkt wurde von nicht-markiertem Material durch Gelfiltrationen an einer 10 ml-Sephadex [®] G-50 Säule getrennt, 30 Minuten bei 70 °C mit 0,3 N NaOH, zur Zerstörung der RNS, behandelt und mit HCl neutralisiert. Die Hybridisierungen wurden wie von Kafatos et al. (Nucleic Acids Res. 7, 1541-1552 (1979) beschrieben, durchgeführt.

E. Identifizierung der Klone pL1-pL30

Die Methode von Birnboim et al., Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523 (1979), zur schnellen Isolierung von Plasmiden wurde verwendet, um 1 μg Plasmid-DNS aus jeder der 500 individuellen E. coli K-12 Stamm 294-Transformanten (vergleiche C) zu gewinnen. Jede DNS-Probe wurde denaturiert und auf Nitrocellulosefilter in dreifacher Ausführung, nach der Methode von Kafatos et al., (siehe oben), aufgebracht.

Die drei Sätze der Nitrocellulosefilter, die 500 Plasmidproben enthielten, wurden hybridisiert mit

- a) induzierter cDNS, gestärkt mit einem T-1 Startersatz,
- b) T-13 gestarteter induzierter cDNS und
- c) nicht induzierter cDNS, hergestellt unter Verwendung beider Startersätze. Klone wurden als positiv angesehen, wenn sie stärker hybridisierten mit einer oder beiden der induzierten cDNS-Sonden als mit der gesamten nicht induzierten Sonde. 30 positive Klone (pL1-pL30) wurden aus den 500 zur weiteren Analyse ausgesucht.

F. Identifikation der Klone pL-31-pL39.

Isolierung eines Plasmids (Nr. 104), das ein LelF-Gen-fragment enthielt.

Transformanten von E. coli x 1776 wurden nach der Koloniehybridisierungsmethode von Grunstein und Hogness (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3961-3965 (1975)) getestet, unter Verwendung von 32 p-markierter induzierter mRNS als Sonde (Lillenhaug et al., Biochemistry, 15, 1858-1865 (1976)). Nichtmarkierte mRNS von nicht-induzierten Zellen wurde mit der Sonde in einem Verhältnis von 200:1 gemischt, um zu konkurrieren mit in dem 32 p-markierten Präparat vorhandener nicht-induzierter mRNS. Die Hybridisierung markierter mRNS sollte vorwiegend bei Kolonien erfolgen, die induzierte Sequenzen enthalten. Drei Klassen von Transformanten wurden erhalten:

- (1) 2-3 % der Kolonien hybridisierten sehr stark mit 32 p-mRNS,
- (2) 10 % hybridisierten signifikant schwächer als die erste Klasse und

(3) der Rest lieferte kein erkennbares Hybridisierungssignal.

Die positiven Kolonien (Klassen (1) und (2)) wurden auf die Anwesenheit Interferon-spezifischer Sequenzen mittels eines Assays geprüft, der auf der spezifischen Hybridisierung von Interferon-mRNS an Plasmid-DNS beruht. Zunächst wurden 60 der stark positiven Kolonien (Klasse (1)) individuell in 100 ml M9-Medium, das ergänzt war mit Tetracyclin (20 µg/ml), Diaminopimelinsäure (100 µg/ml), Thymidin (20 µg/ml) und d-Biotin (1 µg/ml), gezüchtet. Das M9-Medium enthält pro Liter: Na_2HPO_4 (6g), KH_2PO_4 (3 g), NaCl (0,5 g) und NH_4Cl (1 g). Nach Autoklavieren wurde 1 ml steriles 1M MgSO_4 und 10 ml steriles 0,01 M CaCl_2 zugesetzt. Jeweils 10 der 60 Kulturen wurden zusammengefaßt und die Plasmid-DNS wurde, wie von Clewell et al., Biochemistry 9, 4428-4440 (1970), beschrieben, isoliert. 10 µg jedes Plasmid-DNS-Pools wurden mit HindIII gespalten, denaturiert und kovalent an DBM-Papier (Diazobenzylloxymethylpapier) gebunden. 1 µg gereinigter mRNS aus induzierten Zellen wurde an jedes Filter hybridisiert. Nicht-hybridisierte mRNS wurde durch Waschen entfernt. Die spezifisch hybridisierte mRNS wurde eluiert und in *Xenopus laevis* Oozyten überführt. In diesem Assay waren alle sechs Pools negativ. Aus 59 schwach positiven Kolonien (Klasse (2)) wurden fünf Pools zu je 10 Kolonien und 1 Pool zu 9 Kolonien gebildet und nach der oben beschriebenen Methode geprüft. Unter den sechs Pools hybridisierte einer (K10) jedesmal, wenn er geprüft wurde, signifikant stärker als die übrigen. Um den spezifischen Interferon-cDNS-Klon zu identifizieren, wurde aus jeder der im Pool K10 zusammengefaßten neun Kolonien Plasmid-DNS hergestellt und individuell geprüft. Zwei der neun Plasmide (Nr. 101 und 104) banden Interferon-mRNS

stärker als die anderen. Aus dem Plasmid Nr. 104 wurde ein besonderes Bgl II-Restriktionsfragment, das 260 Basenpaare enthielt, isoliert, 32 P-markiert nach der von Taylor et al., Biochim. Biophys. Acta 442, 324-330 (1976), beschriebenen Methode und als Sonde verwendet, um 400 E. coli 294-Transformanten nach einem in situ-Kolonie-Screeningverfahren (Grunstein und Hogness, Proc. Natl. Sci. U.S.A. 72, 3961-3965 (1975)) zu testen. Neun Kolonien (pL31-pL39) wurden identifiziert, die in verschieden starkem Masse mit dieser Sonde hybridisierten.

Zusätzlich wurde das markierte 260-Basenpaar-Fragment verwendet, um 4000 E. coli 294-Transformanten in derselben Weise zu testen. 50 Kolonien konnten identifiziert werden, die in unterschiedlichem Masse mit dieser Sonde hybridisierten. Eine enthielt das LeIF G-Fragment, eine enthielt das LeIF H-Fragment und eine enthielt ein Fragment, das als LeIF H1 bezeichnet wurde (offensichtlich ein Allel von LeIF H). Die hybriden Plasmide, die erhalten wurden, wurden "LeIF G", "pLeIF H", usw., bezeichnet.

G. Isolierung und Sequenzierung eines ersten vollständigen LeIF Gens.

Plasmid DNS wurde aus allen 39 potentiellen LeIF-cDNS-Klonen hergestellt und nochmals mit der gleichen 260 Basenpaare-enthaltenden DNS-Sonde getestet, unter Verwendung des Hybridisierungsprozederes von Kafatos et al. (siehe oben). Drei Plasmide (pL4, pL31, pL34) gaben sehr starke Hybridisierungssignale, vier (pL13, pL30, pL32, pL36) hybridisierten mittelmäßig, während drei (pL6, pL8, pL14) nur schwach mit der Sonde hybridisierten.

Die 39 potentiellen LeIF cDNS Rekombinant-Plasmide wurden ebenfalls unter Verwendung der ^{32}p -markierten synthetischen Undecameren (individuelle T-1 Starterpools oder individuelle T-13 Starter) als Hybridisierungssonden getestet. Die Hybridisierungsbedingungen wurden so ausgewählt, daß eine perfekte Basen-Paarung notwendig war, um feststellbare Hybridisierungssignale zu erhalten (Wallace et al., Nucleic Acids Res. 6, 3543-3557 (1979)). Auf diese Weise wurde Plasmid-DNS aus den 39 Klonen nach einer Standardmethode (Clewell et al., siehe oben) hergestellt und mittels Biorad Agarose A-50 Säulenchromatographie gereinigt. Proben von je 3 μg jedes Präparates wurden durch Behandlung mit EcoRI linearisiert, mit Alkali denaturiert und auf 2 Nitrocellulosefilter getüpfelt (1,5 μg /Fleck) wie von Kafatos et al., (siehe oben) beschrieben. Die individuellen synthetischen Deoxyoligonucleotid-Starter und Starterpools wurden mit (γ - ^{32}p)ATP folgendermaßen phosphoryliert: 50 pmol Oligonucleotid und 100 pmol γ - ^{32}p ATP (New England Nuclear, 2500 Ci/mMol) wurden mit 30 μl 50 mMol Tris-HCl, 10 mMol MgCl_2 und 15 mMol β -Mercaptoethanol versetzt. Es wurden 2 Einheiten T4 Polynucleotid-Kinase zugesetzt und nach 30 Minuten bei 37 °C wurden die ^{32}p -markierten Starter durch Chromatographie an 10 ml Sephadex[®] G-50-Säulen gereinigt. Die Hybridisierungen wurden unter Verwendung von 10^6 cpm Starter T-13C oder 3×10^6 cpm Starterpool T-1C durchgeführt und zwar bei 15 °C während 14 Stunden in 6 x SSC (1 x SSC = 0,15 M NaCl, 0,015 M Natriumcitrat, pH 7,2), 10 x Denhardt's Lösung (0,2 % Rinderserumalbumin, 0,2 % Polyvinylpyrrolidon, 0,2 % Ficoll), wie von Wallace et al. (siehe oben) beschrieben. Die Filter wurden während 5 Minuten bei 0 °C in 6 x SSC gewaschen, getrocknet und Röntgenfilm ausgesetzt. Die Ergebnisse sind in Figur 2 für ^{32}p -

Starterpool T-13C und Starter T-1C dargestellt.

Die Plasmid-DNS aus Klon 104 lieferte bemerkenswerte Hybridisation mit Starterpool T-1C und Starter T-13C, während Hybridisation mit den anderen Undecameren nicht festgestellt werden konnte. Wie in Figur 2 dargestellt, hybridisierten verschiedene der 39 potentiellen LeIF-Plasmide (pL2, 4, 13, 17, 20, 30, 31, 34) mit diesen beiden Sonden. Die Restriktionsanalyse zeigte jedoch, daß nur 1 der Plasmide, pL31, auch ein 260 Basenpaare-enthaltendes BglII-Fragment enthielt. PstI-Behandlung von pL31 zeigte, daß die Größe des cDNS-Abschnittes etwa 1000 Basenpaare war.

Der gesamte PstI Abschnitt von pL31 wurde sowohl nach der chemischen Methode von Maxam-Gilbert (Methods Enzymol. 65, 499-560 (1980)) wie nach der Dideoxy-Kettenbruchmethode (Smith, Methods Enzymol. 65, 560-580 (1980)) durchgeführt, nachdem die Sau3a-Fragmente in einen M13-Vektor unterkloniert worden waren. Die DNS-Sequenz ist in Figur 3 ("A") gezeigt. Aus dieser Sequenz wurde die gesamte Aminosäuresequenz des LeIF A vorhergesagt, einschließlich des Prä- oder Signalpeptids. Der erste ATG Translations-Startcodon befindet sich 60 Nukleotide vom 5'-Ende der Sequenz entfernt und wird nach 188 Codons von einem TGA Stop-triplett gefolgt. Es gibt 342 nicht übersetzte Nucleotide am 3'-Ende, die schließlich von einer Poly (A)-Sequenz gefolgt werden. Das mutmaßliche Signalpeptid (wahrscheinlich beteiligt an der Sekretion von reifem LeIF aus Leukozyten) ist 23 Aminosäuren lang. Das aus 165 Aminosäuren bestehende reife LeIF A hat ein berechnetes Molekulargewicht von 19,390. Der Figur 4 kann entnommen werden, daß die tryptischen Peptide T-1 und T-13 den Aminosäuren 145-149 und 57-61 des LeIF A entsprechen. Die tatsächlichen DNS-Sequenzen,

die in diesen beiden Regionen gefunden wurden, werden durch den Starterpool T1-C und den Starter T13-C (Figur 8) dargestellt.

H. Direkte Expression von reifem Leukozyten-Interferon A (LeIF A)

1. Allgemeines

Die Methode, nach der das reife LeIF A direkt expri-
miert wurde, ist eine Variante der früher bereits für das
menschliche Wachstumshormon angewandten (Goeddel et al.,
Nature 281, 544-548 (1979)), insofern es eine Kombination
von synthetischer (N-terminal) und komplementärer DNS
darstellte.

Wie in Figur 6 gezeigt, befindet sich zwischen den
Codons 1 und 3 von LeIF A eine Sau3a-Restriktionsendo-
nuclease-Stelle. Es wurden 2 synthetische Deoxyolynucleo-
tide geschaffen, die einen ATG-Translations-Startcodon
enthalten, den Codon für die Aminosäure 1 (Cystein) wieder-
herstellen und ein EcoRI kohäsives Ende schaffen. Diese
Oligomeren wurden an ein Sau3a-AvaII Fragment von pL31,
das aus 34 Basenpaaren bestand, gehängt. Das entstandene
45 Basenpaare enthaltende Produkt wurde an 2 zusätzliche
DNS-Fragmente gehängt, so daß ein künstlich-natürliches
Hybridgen aus 865 Basenpaaren entstand, das LeIF A ko-
dierte und welches durch EcoRI- und PstI-Restriktions-
stellen begrenzt ist. Dieses Gen wurde zwischen die EcoRI-
und PstI-Restriktionsstellen des Plasmids pBR322 einge-
fügt und lieferte das Plasmid pLeIF A1.

2. Konstruktion des Tryptophan-Kontrollelements (enthaltend den E. coli trp Promoter, Operator und die trp-Leader-Ribosomenbindungsstelle ohne die ATG-Sequenz für den Translationsbeginn).

Das Plasmid pGMI trägt das E. coli-Tryptophan-Operon mit der Deletion Δ LE1413 (Miozzari et al., J. Bacteriology 133, 1457-1466 (1978)) und exprimiert daher ein Fusionsprotein mit den ersten 6 Aminosäuren des trp-Leaders und etwa dem letzten Drittel des trp E-Polypeptids (im folgenden LE' genannt), sowie dem vollständigen trp D-Polypeptid, und zwar unter der Kontrolle des trp-Promotor-Operator-Systems. Das Plasmid (20 μ g) wurde mit dem Restriktionsenzym PvuII an 5 Stellen gespalten. Die Genfragmente wurden dann mit EcoRI-Verbindungssequenzen (bestehend aus einer selbstkomplementären Polynukleotidsequenz pCATGAATTCATG) bombiniert, um eine EcoRI-Spaltstelle für das spätere Klonieren in ein Plasmid mit einer solchen EcoRI-Spaltstelle zu schaffen. Die 20 μ g der aus pGM1 erhaltenen DNS-Fragmente wurden mit 10 Einheiten T_4 DNS-Ligase in Gegenwart von 200 pMol des 5'-phosphorylierten synthetischen Oligonucleotids pCATGAATTCATG in 20 μ l T_4 DNS-Ligase-Puffer (20 mMol Tris, pH 7,6, 0,5 mMol ATP, 10 mMol $MgCl_2$, 5 mMol Dithiothreitol) bei 4 °C über Nacht behandelt. Die Lösung wurde dann 10 Minuten auf 70 °C erwärmt. Die Verbindungssequenzen wurden mit EcoRI gespalten und die Fragmente, die nun EcoRI-Enden enthielten, wurden mittels 5 % Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Die drei größten Fragmente wurden aus dem Gel isoliert. Dazu wurde zunächst mit Ethidiumbromid angefärbt, die lokalisierten Fragmente wurden unter UV-Licht ausgemacht und die betreffenden Regionen aus dem Gel herausgeschnitten. Jedes Gelfragment wurde mit 300 Microliter 0,1 x TBE in eine Dialysetasche gebracht und während 1 Stunde in 0,1 x TBE-Puffer der

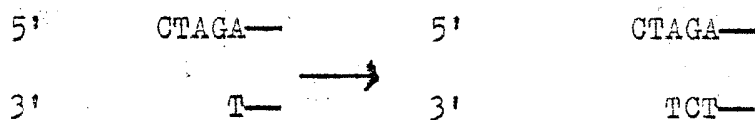
Elektrophorese bei 100 Volt ausgesetzt (TBE-Puffer enthält: 10,8 g Tris-Base, 5,5 g Borsäure, 0,09 g Na_2EDTA in 1 Liter H_2O). Die wässrige Lösung wurde gesammelt, mit Phenol extrahiert, mit Chloroform extrahiert und 0,2M an Natriumchlorid gemacht. Die DNS wurde nach Ethanol-fällung in wässriger Lösung erhalten. Das den trp-Promoter-Operator enthaltende Gen mit EcoRI kohäsiven Enden wurde nach der im folgenden beschriebenen Methode identifiziert, die darin besteht, daß man Fragmente in ein Tetracyclin-empfindliches Plasmid einbaut, die durch Einbau eines Promotor-Operators Tetracyclin-resistent werden.

Das Plasmid pBRHI (Rodriguez et al., Nucleic Acids Res. 6, 3267-3287 (1979)) exprimiert Ampicillinresistenz und enthält das Gen für Tetracyclinresistenz, aber, weil kein zugehöriger Promoter existiert, exprimiert diese Resistenz nicht. Das Plasmid ist daher Tetracyclin-empfindlich. Durch Einfügung eines Promoter-Operator-Systems an der EcoRI-Spaltstelle kann das Plasmid Tetracyclin-resistent gemacht werden.

pBRHI wurde mit EcoRI behandelt und das Enzym durch Phenolextraktion und Chloroformextraktion entfernt. Das nach Ethanolpräzipitation in Wasser erhaltene DNS-Molekül wurde in getrennten Reaktionsgemischen kombiniert mit jedem der drei DNS-Fragmente, die oben erhalten wurden und mit T_4 DNS-Ligase, wie bereits beschrieben, verbunden. Die DNS des Reaktionsgemischs wurde zur Transformation kompetenter E. coli K-12 Stamm 294-Organismen nach Standardmethoden (Hersfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3455-3459 (1974)) verwendet. Die Bakterien wurden auf LB (Luria-Bertani)-Platten gebracht, die 20 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin und 5 $\mu\text{g/ml}$ Tetracyclin enthielten. Es wurden verschiedene Tetracyclin-resistenten

stente Kolonien ausgewählt, die Plasmid-DNS isoliert und das Vorhandensein des gewünschten Fragmentes durch Restriktions-
enzymanalysen bestätigt. Das entstandene Plasmid wurde
pBRHtrp genannt.

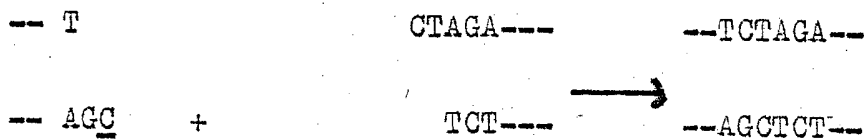
Ein EcoRI und BamHI Digestionsprodukt des Genoms des
Hepatitis B-Virus wurde nach bekannten Methoden erhalten und
in die EcoRI und BamHI Spaltstellen des Plasmids pGH6 einge-
fügt (Goeddel et al., Nature 281, 544 (1979)), wodurch das
Plasmid pHS32 entstand. Das Plasmid pHS32 wurde mit XbaI ge-
spalten, mit Phenol extrahiert, mit Chloroform extrahiert und
der Ethanolpräzipitation unterworfen. Es wurde dann mit 1 µl
E. coli DNS-Polymerase I, Klenow Fragment (Boehringer-Mann-
heim), in 30 µl Polymerase-Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH
7.4, 7mM MgCl₂, 1 mM β-Mercaptoethanol), enthaltend 0,1 mM
dTTP und 0,1 mM dCTP, während 30 Minuten bei 0 °C und 2
Stunden bei 37 °C behandelt. Durch diese Behandlung wurde
die XbaI Spaltstelle folgendermaßen verändert:



Dieser lineare Rest des Plasmids pHS32 (nach Phenol- und
Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation in Wasser)
wurde mit EcoRI gespalten. Das große Plasmidfragment wurde
vom kleinen EcoRI-XbaI-Fragment abgetrennt durch PAGE und nach
Elektroelution isoliert. Dieses DNS-Fragment von pHS32 (0,2
µg) wurde unter ähnlichen Bedingungen wie den obenbeschrie-
benen an das EcoRI-TaqI-Fragment des Tryptophanoperons (etwa
0,01 µg) aus pBRHtrp gebunden. Dabei geschieht folgendes:

9.12.1983

62 991/12/37



mit der ungewöhnlichen Basenpaarung T-C. Ein Teil des Reaktionsgemisches wurde in *E. coli* 294-Zellen transformiert, hitzebehandelt und auf LB-Platten, die Ampicillin enthielten, gebracht. Es wurden 24 Kolonien ausgewählt, in 3 ml LB-Medium aufgezogen und das Plasmid isoliert. Es wurde festgestellt, daß sechs davon die *Xba*I-Spaltstellen im *E. coli* durch katalysierte DNS-Ausbesserung und Replikation regeneriert hatten in folgender Weise:



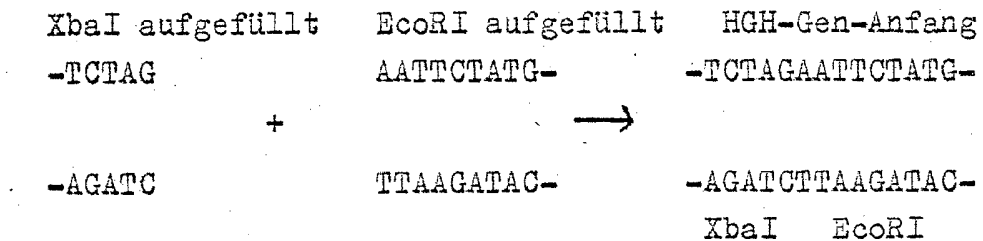
Diese Plasmide konnten auch mit *Eco*RI und *Hpa*I gespalten werden und lieferten die erwarteten Restriktionsfragmente. Ein Plasmid, pTrp114 bezeichnet, wurde für die Expression heterologer Peptide, wie im folgenden beschrieben, verwendet.

Das Plasmid pGH 107 (Goeddel et al., Nature 281, 544, (1979)) enthält ein Gen für das menschliche Wachstumshormon, bestehend aus 23 synthetisch hergestellten Aminosäurerecodons und 153 Aminosäurecodons, die von cDNS über reverse Transcription der mRNS erhalten wurde. Dieses Gen, obgleich es den Codon der Präsequenz des menschlichen Wachstumshormons nicht enthält, besitzt ein ATG-Translations-Startcodon. Das Gen wurde aus 10 µg pGH 107 isoliert nach Behandlung mit *Eco*RI und *E. coli* DNA Polymerase I Klenow-Fragment, sowie dTTP und dATP, wie oben beschrieben. Nach Phenol- und Chloroformextraktion sowie Ethanolpräzipitation wurde das Plasmid mit *Bam*HI behandelt.

Das das HGH-Gen enthaltende Fragment wurde durch PAGE und Elektroelution isoliert. Das erhaltene DNS-Fragment enthält auch die ersten 350 Nukleotide des Tetracyclineresistenz-verleihenden Strukturgens, aber es fehlt ihm das Tetracyclin Promoter-Operator-System, so daß wenn es anschließend in ein Expressionsplasmid kloniert wird, diejenigen Plasmide, die diesen Abschnitt enthalten, durch die wiedergewonnene Tetracyclinresistenz identifiziert werden können. Weil das EcoRI-Ende des Fragments aufgefüllt wurde nach dem Klenow-Polymerase I-Verfahren, hat das Fragment ein stumpfes Ende und ein kohäsives Ende, wodurch die richtige Orientierung gesichert ist, wenn es später in ein Expressionsplasmid eingefügt wird.

Als nächstes wurde das Plasmid pTrp14 für den Empfang des das HGH-Gen enthaltende Fragment, das oben hergestellt wurde, vorbereitet. pTrp14 wurde mit XbaI behandelt und die entstehenden kohäsiven Enden wurden nach dem Klenow-Polymerase I-Verfahren unter Verwendung von dATP, dTTP, dGTP und dCTP aufgefüllt. Nach Phenol- und Chloroform-Extraktion sowie Ethanolpräzipitation wurde die erhaltene DNS mit BamHI behandelt und das entstandene groß Plasmidfragment wurde durch PAGE und Elektroelution eluiert. Dieses Fragment besaß ein stumpfes und ein kohäsives Ende und erlaubte die Rekombination in der richtigen Richtung mit dem das HGH-Gen enthaltenden Fragment, dessen Herstellung oben beschrieben wurde.

Das das HGH-Gen enthaltende Fragment und das pTrp14 Δ Xba-BamHI-Fragment wurden kombiniert und miteinander verbunden unter ähnlichen Bedingungen wie diejenigen, die vorstehend beschrieben sind. Durch die Verbindung der aufgefüllten XbaI- und EcoRI-Enden wurden die XbaI- und EcoRI-Restriktionsstellen wieder hergestellt:



Durch diese Konstruktion wurde auch das Tetracyclinresistenz-Gen wiederhergestellt. Weil das Plasmid pHGH 107 Tetracyclinresistenz von einem Promoter, der stromaufwärts vom HGH-Gen (Lac-Promoter) liegt, exprimiert, erlaubt das vorstehend konstruierte Plasmid, bezeichnet pHGH 207, die Expression des Gens für Tetracyclinresistenz unter der Kontrolle des Tryptophan-Promoter-Operators. Das erhaltene Gemisch wurde in E. coli 294 transformiert und die Kolonien wurden auf LB-Platten, die 5 µg/ml Tetracyclin enthielten, selektioniert.

Das Plasmid pHGH 207 wurde mit EcoRI behandelt und ein 300 Basenpaare-enthaltendes Fragment wurde durch PAGE und Elektroelution erhalten, das den trp-Promoter, Operator und die trp-Leader-Ribosomenbindungsstelle enthielt, dem aber eine ATG-Sequenz für den Start der Translation fehlte. Dieses DNS-Fragment wurde in die EcoRI-Spaltstelle von pLeIF A kloniert. Expressionsplasmide, die das so modifizierte trp-Regulon (E. coli-Operon, dem die Attenuator-Sequenz fehlt, so daß die Expression erhöht ist) können bis zu vorgegebenen Konzentrationen herangezüchtet werden in einem Medium, das genügend Tryptophan enthält, um das Promoter-Operatorsystem zu unterdrücken. Wird dann das Tryptophan entzogen und das System entblockiert, so wird das gewünschte Produkt exprimiert.

Im vorliegenden Fall und wie in Figur 6 dargestellt, wurden 250 µg des Plasmids pL31 mit PstI behandelt und das 1000 Basenpaare-enthaltende Teilstück durch Gelelektrophorese

an einem 6 % Polyacrylamidgel isoliert. Es wurden etwa 40 μg des Teilstücks aus den Gel durch Elektroelution erhalten und in 3 gleiche Teile für die weitere Behandlung aufgeteilt:

a) Eine 16 μg -Probe des Fragments wurde teilweise gespalten mit 40 Einheiten von BglII während 45 Minuten bei 37 °C und das Reaktionsgemisch wurde an einem 6 % Polyacrylamidgel gereinigt. Etwa 2 μg des gewünschten 670 Basenpaare-enthaltenden Fragments wurden erhalten. b) Eine andere Probe (8 μg) des 1000 Basenpaare-enthaltenden PstI-Bruchstücks wurde mit AvaII und BglII behandelt. 1 μg des in Figur 6 gezeigten 150 Basenpaare enthaltenden Fragments wurden nach Gelelektrophorese erhalten. c) 16 μg des 1000 Basenpaare-enthaltenden Fragments wurden mit Sau3a und AvaII behandelt. Nach Elektrophorese an 10 % Polyacrylamidgel wurden etwa 0,25 μg (10 pMol) des 34 Basenpaare-enthaltenden Fragments erhalten. Die zwei angegebenen Deoxyolinnucleotide, 5'-dAATTCATGTGT (Fragment 1) und 5'-dGATCACACATG (Fragment 2) wurden nach der Phosphotriestermethode synthetisiert. Das Fragment 2 wurde folgendermaßen phosphoryliert: 200 μl (etwa 40 pM) von (γ - ^{32}P) ATP (Amersham, 5000 Ci/mM) wurden zur Trockne gebracht und in 30 μl 60 mM Tris-HCl (pH 8), 10mM MgCl_2 , 15 mM β -Mercaptoethanol, 100 pM des DNS-Fragments und 2 Einheiten T4 Polynukleotid-Kinase resuspendiert. Nach 15 Minuten bei 37 °C wurde 1 μl 10mM ATP hinzusetzt und die Reaktion weitere 15 Minuten lafengelassen. Das Gemisch wurde dann während 15 Minuten auf 70 °C erwärmt, mit 100 pM des 5'-OH-Fragments 1 und 10 pM des 34 Basenpaare-enthaltenden Sau3a-AvaII-Fragments versetzt. Die Verbindung wurde bei 4 °C während 5 Stunden in 50 ml 20mM Tris-HCl (pH 7,5), 10mM Mg Cl_2 , 10mM Dithiothreit, 0,5mM ATP und 10 Einheiten T4 DNS-Ligase hergestellt. Das Gemisch wurde der Elektrophorese an einem 6% Polyacrylamidgel unterworfen und das 45 Basenpaare-enthaltende Produkt wurde durch Elektroelution erhalten. Etwa 30 ng (1 pM) des 45 Basenpaare-enthaltenden Produkts wurden mit 0,5 μg (5 pM) des 150 Basenpaare-ent-

haltenden *Ava*II - *Bgl*II-Fragments und 1 μ g (2 pM) des 670 Basenpaare-enthaltenden *Bgl*II - *Pst*I-Fragments vereint. Die Bindung wurde bei 20 °C während 16 Stunden unter Verwendung von 20 Einheiten T4 DNS-Ligase hergestellt. Die Ligase wurde dann durch Erhitzen auf 65 °C während 10 Minuten inaktiviert und das Gemisch wurde mit *Eco*RI und *Pst*I behandelt zwecks Spaltung von Polymeren des Gens. Das Gemisch wurde dann durch PAGE (6 %) gereinigt. Es wurden etwa 20 ng (0,04 pM) des 865 Basenpaare-enthaltenden Produkts isoliert. Eine Hälfte davon (10 ng) wurde zwischen die *Eco*RI- und *Pst*I-Spaltstellen von pBR322 (0,3 μ g) eingefügt. Die Transformation von *E. coli* 294 lieferte 70 Tetracyclin-resistente, Ampicillin-empfindliche Transformanten.

Die aus 18 dieser Transformanten isolierte Plasmid-DNS wurde mit *Eco*RI und *Pst*I behandelt. 16 der 18 Plasmide besaßen ein *Eco*RI - *Pst*I-Fragment, das 865 Base paare lang war. 1 μ g eines dieser Plasmide (pLeIF A1) wurde mit *Eco*RI behandelt und an das 300 Basenpaare enthaltende *Eco*RI-Fragment (0,1 μ g), das den *E. coli* *trp*-Promoter und die *trp*-Leader-Ribosomenbindungsstelle enthielt, gebunden. Die den *trp*-Promoter enthaltenden Transformanten wurden unter Verwendung einer *trp*-Sonde nach der Grunstein-Hogness Kolonie-Screening-Methode identifiziert. Eine asymmetrisch sitzende *Xba*I-Spaltstelle in dem *trp*-Fragment erlaubte die Bestimmung von Rebombinanten, in denen der *trp*-Promoter in der Richtung des LeIF A-Gens orientiert war.

I. In vitro und in vivo Aktivität von LeIF A

Extrakte für den IF-Assay wurden folgendermaßen hergestellt: 1 ml-Kulturen wurden in L-Brühe, enthaltend 5 μ g/ml Tetracyclin, bis zu einem A_{550} -Wert von etwa 1,0 auf-

gezogen, dann mit 25 ml M9-Medium, enthaltend 5 µg/ml Tetracyclin verdünnt. Wenn der A₅₅₀-Wert 1,0 erreicht hatte, wurden jeweils 10 ml-Proben zentrifugiert und die Zellkuchen in 1 ml 15%iger Saccharose, 50 ml-Tris-HCl (pH 8,0 und 50 mM EDTA suspendiert. 1 mg Lysozym wurde zugesetzt und nach 5-minütiger Aufbewahrung bei 0 °C wurden die Zellen durch Ultrabeschallung zerstört. Es wurde 10 Minuten zentrifugiert (15.000 U/min) und die Interferon-Aktivität im Überstand wurde bestimmt durch Vergleich mit LeIF-Standard nach dem CPE-Hemmtest. Zur Bestimmung der Anzahl von IF-Molekülen pro Zelle wurde eine spezifische LeIF-Aktivität von 4×10^8 Einheiten pro mg verwendet.

Wie in Tabelle 1 gezeigt, liefert Klon pLeIF A trp 25, in dem der trp-Promoter in der richtigen Richtung orientiert ist, hohe Aktivitäten (bis zu $2,5 \times 10^8$ Einheiten pro Liter). Wie in Tabelle 2 gezeigt, verhält sich das von E. coli K-12 Stamm 294/pLeIF A trp 25 hergestellte Interferon wie authentisches Human-LeIF; es ist bei pH 2 stabil und wird durch Kaninchen-anti-Human-Leukozyten-Antikörper neutralisiert. Das Interferon hat ein scheinbares Molekulargewicht von etwa 20.000.

Der Nachweis von in vivo-Aktivität von Interferon macht die Gegenwart von Makrophagen und natürlichen Killerzellen (NK) notwendig, und es scheint, daß diese Zellen stimuliert werden. Es war daher möglich, daß das von E. coli 294/pLeIF A 25 produzierte Interferon, das im Zellkultur-Assay antivirale Aktivität zeigte, an infizierten Tieren inaktiv ist. Ferner ist es durchaus möglich, daß sich die antivirale in vivo-Aktivität des bakteriell hergestellten, nicht-glykosylierten LeIF A von der des glykosylierten Inter-

ferons, das aus menschlichen Leukozyten gewonnen wird, unterscheidet. Es wurden daher die biologischen Aktivitäten von bakteriell hergestelltem LeIF A (2 % rein) und von aus Leukozyten isoliertem LeIF (8 % rein) miteinander verglichen und zwar an Hand der lethalen Enzephalomyocarditis (EMC) bei Totenkopffaffen (Tabelle 3).

Tabelle 1: Interferon-Aktivität in Extrakten von E. coli

E.coli K-12 Stamm 294 transformiert durch	Zelldichte (Zellen/ml)	IF-Aktivität E/ml Kultur	LeIF-Mole- küle pro Zelle
pLeIF A trp 25	$3,5 \times 10^8$	36.000	9.000
pLeIF A trp 25	$1,8 \times 10^9$	250.000	12.000

Tabelle 2: Vergleich der Aktivität von Extrakten aus E. coli 294/pLeIF A 25 mit Standard-LeIF x)

	Interferon-Aktivität (E/ml)		
	unbehandelt	pH 2	Kaninchen-anti- Human-Leukozyten- Antikörper
294/pLeIF A trp 25- Extrakt	500	500	< 10
LeIF-Standard	500	500	< 10

x)

Der 250.000 E/ml enthaltende Extrakt von E. coli 294/pLeIF A trp 25, der in Tabelle 1 beschrieben wird, wurde auf das 500-fache verdünnt mit Minimalmedium, so daß er eine

spezifische Aktivität von 500 E/ml aufwies. Ein vorher gegen NIH-Leukozyten-Interferon-Standard titrierter Leukozyten-Interferon-Standard (Wadley Institute) wurde ebenfalls auf eine Endkonzentration von 500 E/ml verdünnt. Aliquote Teile (jeweils 1 ml) wurden mit 1 N HCl auf pH 2 gebracht, 52 Stunden bei 4 °C inkubiert, durch Zusatz von NaOH neutralisiert und die IF-Aktivität nach dem Standard-CPE-Hemmtest bestimmt. Aliquote Teile (25 µl) der 500 E/ml-Proben (unbehandelt) wurden mit 25 µl Kaninchen-anti-Human-Leukozyten-Interferon während 60 Minuten bei 37 °C inkubiert, zentrifugiert mit 12,000 x g während 5 Minuten und der Überstand getestet.

Tabelle 3: Antiviraler Effekt verschiedener LeIF-Präparate gegen EMC Virus - Infektionen bei Totenkopffaffen

Behandlung	Überlebende	Serum PFu/ml		
		Tag 2	Tag 3	Tag 4
Kontrolle (Bakterienproteine)	0/3	10 } 0 } 3 0 }	3x10 ⁴ } 0 } 10 ⁴ 0 }	10 ⁵ } 1.200 } 3.4x 0 } 10 ⁴
Bakterielles LeIF A	3/3	0 0 0	0 0 0	0 0 0
LeIF-Standard	3/3	0 0	0 0	0 0

Alle Affen waren männlichen Geschlechts (mittleres Gewicht 713 g) und besaßen keine EMC Virus-Antikörper vor der Infektion. Die Affen wurden intramuskulär mit $100 \times \text{LD}_{50}$ EMC-Virus (bestimmt an Mäusen) infiziert. Die Kontrolltiere starben 134, 158 und 164 Stunden nach der Infektion. Die Interferon-Behandlung mit 10^6 Einheiten erfolgte intravenös und zwar -4, +2, 23, 29, 48, 72, 168 und 240 Stunden nach der Infektion. Bei dem bakteriellen Leukozyten-Interferon handelte es sich um eine Säulenchromatographie-Fraktion eines Lysats aus E. coli 294/pLeIF A 25 mit einer spezifischen Aktivität von $7,4 \times 10^6$ E/mg Protein. Die bei den Kontrollen verwendeten Bakterien-Proteine waren der Säulenfraktion des Lysats von E. coli 294/pBR322 bei doppelter Gesamtproteinkonzentration äquivalent. Bei dem Leukozyten-Interferon-Standard handelte es sich um durch Sendai-Virus induziertes Interferon aus normalen menschlichen Zellen, das chromatographisch auf eine spezifische Aktivität von 32×10^6 E/mg Protein gereinigt war.

Die Kontrolltiere verloren das Gleichgewicht, zeigten progressive Lethargie, schlaffe Lähmung der hinteren Gliedmassen und wässrige Augen, beginnend etwa 8 Stunden vor dem Tod. Die mit Interferon behandelten Affen zeigten keine dieser Abnormalitäten: sie blieben während der gesamten Zeit aktiv und entwickelten keine Virämie. Der eine Affe der Kontrollgruppe, der innerhalb von 4 Tagen keine Virämie entwickelte, starb zuletzt (164 Stunden nach der Infektion), aber zeigte nach dem Tode hohe Virus-Titer im Herzen und Gehirn. Die Interferon-behandelten Affen entwickelten keine Antikörper gegen EMC-Viren, was 14 und 21 Tage nach der Infektion festgestellt wurde. Die Ergebnisse zeigen somit, daß der antivirale Effekt der LeIF-Präparate an den infizierten Tieren lediglich der Wirkung des Interferons zugeschrieben werden kann, da die kontaminierenden Proteine des bakteriell-

len und des aus Leukozyten gewonnenen Interferons völlig unterschiedlich sind. Außerdem deuten die Ergebnisse daraufhin, daß für eine in vivo antivirale Aktivität von LeIF A eine Glykosylierung nicht notwendig ist.

J. Isolierung von CDNS für weitere Leukozyten-Interferone

DNS aus dem Plasmid, das DNS für das vollständige LeIF A enthält, wurde mit PstI herausgeschnitten, elektrophoretisch isoliert und mit ^{32}P markiert. Die erhaltene radioaktiv markierte DNS wurde als Sonde für das Screening von zusätzlichen E. coli 294-Transformanten verwendet, die in der gleichen Weise, wie in Teil C beschrieben, erhalten wurden (nach der in-situ-Kolonie-Testmethode von Grunstein und Hogness (siehe oben)). Die mit der Sonde hybridisierenden Kolonien wurden isoliert. Plasmid-DNS aus diesen Kolonien sowie aus den zehn hybridisierenden Kolonien, die in Teil G oben erwähnt wurden, wurden durch Behandlung mit PstI herausgeschnitten und nach drei verschiedenen Methoden charakterisiert. Zunächst wurden diese PstI-Fragmente durch die Abbauprodukte, die durch Behandlung mit der Restriktions-Endonucleasen BglII, PvuII und EcoRI entstanden, charakterisiert. Die Analyse erlaubte die Klassifizierung von mindestens acht unterschiedlichen Typen (LeIF A, LeIF B, LeIF C, LeIF D, LeIF E, LeIF F, LeIF G und LeIF H), dargestellt in Figur 5, wie einen Überblick über die Lage der verschiedenen Restriktionsstellen relativ zu der bis jetzt bekannten Präsequenz und der kodierenden Sequenz von LeIF A gibt. Ein Typ von diesen, LeIF D, ist anscheinend identisch mit dem von Nagata et al., Nature 284, 316-320 (1980), beschriebenen LeIF.

Ferner wurden verschiedene DNSs mit dem von Cleveland et al. (Cell 20, 95-105 (1980)) beschriebenen Hybridisations-Selektions-Test untersucht auf ihre Fähigkeit, LeIF-mRNS selektiv von Poly-A enthaltender RNS aus KG-1 Zellen zu entfernen. In diesem Test waren LeIF A, B, C und F positiv. Schließlich wurden letztere PstI-Fragmente in Plasmide eingefügt, E. coli 294 wurde mit diesen Plasmiden transformiert und die Fragmente wurden exprimiert. Die exprimierten Produkte, von denen man annahm, daß sie Präinterferone wären, waren im CPE-Assay auf Interferon-Aktivität alle positiv, wobei nur das LeIF F-Fragment geringfügige Aktivität aufwies. Im übrigen wurden alle LeIF-Typen sequenziert.

K. Direkte Expression eines zweiten reifen Leukozyten-Interferons (LeIF B)

Die Sequenz des isolierten DNS-Fragments, welches das Gen für reifes LeIF B enthält, zeigt, daß die ersten vierzehn Nucleotide für LeIF A und B identisch sind. Folglich wurde ein Fragment aus pLeIF A 25, das den trp-Promoter-Operator, die Ribosomenbindungsstelle und den Beginn des LeIF A (=B)-Gens enthielt, isoliert und mit dem Rest der B-Sequenz in einem Expressions-Plasmid kombiniert. Die Restriktionskarten für die Pst-Fragmente von pL4 (ein Plasmid, enthaltend das LeIF B-Gen aus Figur 5) und pLeIF A 25 sind in den Figuren 7a und 7b dargestellt.

Um das etwa 950 (=Basenpaare) lange Sau3a-PstI-Fragment aus der Sequenz, die in Figur 7a dargestellt ist, zu erhalten, waren mehrere Schritte notwendig wegen des Vorkommens weiterer, in diesem Bereich liegender Sau3a-Restriktionsstellen. Es wurde folgendermaßen vorgegangen:

1. Die folgenden Fragmente wurden isoliert:

- a) 110 b.p. aus Sau3a-EcoRI;
- b) 132 b.p. aus EcoRI-Xba;
- c) 700 b.p. aus Xba-Pst.

2. Die Fragmente (1a) und (1b) wurden miteinander verbunden und mit Xba und BglIII behandelt, um Selbstpolymerisation über die Sau 3a- und Xba-Enden zu verhindern (die entsprechende Sau 3a-Spaltstelle lag innerhalb einer BglIII-Spaltstelle; BglIII-Schnitte hinterlassen ein Sau 3a kohäsives Ende). Es wurde ein 242 b.p. enthaltendes Fragment isoliert.

3. Das Produkt von (2) wurde mit (1c) verbunden und mit PstI und BglIII behandelt, wieder um Selbstpolymerisation zu verhindern. Ein etwa 950 b.p. enthaltendes Fragment, Sau 3a-PstI (siehe Figur 7a) wurde isoliert. Dieses Fragment enthielt denjenigen Teil des LeIF B-Gens, der keine Entsprechung beim LeIF A hatte.

4. Ein etwa 300 b.p. enthaltendes Fragment (HindIII-Sau3a), das den trp-Promoter-Operator, die Ribosomenbindungsstelle, das ATG-Startsignal und den Cystein-Codon von LeIF A enthielt, wurde aus pLeIF A25 isoliert.

5. Ein etwa 3600 b.p. enthaltendes Fragment (PstI-HindIII) wurde aus pBR322 isoliert. Es enthielt das Replikon, das Tetracyclin-Resistenz, nicht aber Ampicillin-Resistenz kodiert.

6. Die Fragmente, die gemäß 3, 4 und 5 erhalten wurden, wurden miteinander verbunden und mit dem resultierenden Plasmid wurde E. coli K-12 Stamm 294 transformiert.

Die Transformanten wurden einem Minitest unterzogen (Birnboim et al., Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523 (1979)) und Plasmidproben wurden mit EcoRI behandelt. Der Abbau lieferte folgende drei Fragmente: 1) Ein EcoRI-EcoRI trp Promoter-Fragment; 2) das innere EcoRI-EcoRI-Fragment von pL4 und 3) das Fragment vom Translations-Startsignal bis zur EcoRI-Spaltstelle von pL4.

Im CPE-Assay zeigen Bakterienextrakte aus Klonen, die in der vorstehend beschriebenen Weise erhalten werden, Aktivitäten von 10×10^6 Einheiten Interferon pro Liter bei $A_{550} = 1$. Ein repräsentativer Klon, der in dieser Weise hergestellt wurde, ist E. coli 294/pLeIF B trp 7.

L. Direkte Expression weiterer reifer Leukozyten Interferone (LeIF C, D, F, H, I und J)

Weitere Genfragmente in voller Länge von anderen LeIF-Typen können geschneidert und in Vektoren eingebaut werden zwecks Expression in Analogie zu der für das LeIF A beschriebenen Weise. Durch vollständige Sequenzierung in konventioneller Weise kann festgestellt werden, ob eine Restriktionsstelle genügend nahe an dem ersten Aminosäurecodon des reifen Interferons liegt, so daß die im Teil H beschriebene Methode für die Expression von reifem LeIF A verwendet werden kann, d. h. die Eliminierung der Präsequenz durch einen Restriktionsschnitt und Ersatz der aminoendständig zusammen mit der Präsequenz verlorenen

Aminosäurecodons durch Anhängen eines synthetischen DNS-Fragments. Sollte dies nicht der Fall sein, so kann die folgende Methode angewandt werden. Hierbei wird das die Präsequenz kodierende Fragment präzise an der Stelle abgetrennt, an der der Codon für die erste Aminosäure des reifen Polypeptids beginnt, und zwar dadurch, daß

1. in der Umgebung dieses Punktes die doppelsträngige DNS in einsträngige DNS übergeführt wird;
2. die im ersten Schritt gebildete einsträngige Region mit einer komplementären Starter-Sequenz einer einsträngigen DNS hybridisiert wird, deren 5'-Ende gegenüber dem Nukleotid liegt, das an die beabsichtigte Spaltstelle grenzt;
3. derjenige Teil des in 3'-Richtung des Starters liegenden zweiten Stranges, der in (1) eliminiert wurde, durch Umsetzung mit DNS-Polymerase in Gegenwart von Adenin-, Thymin-, Guanin- und Cytosin-haltigen Deoxynucleotid-triphosphaten wieder hergestellt wird und
4. die verbleibende einsträngige DNS-Sequenz, die über die beabsichtigte Spaltstelle hinausreicht, abgebaut wird.

Eine kurz synthetische DNS-Sequenz, die am 3'-Ende des kodierenden Stranges mit dem Translations-Startsignal ATG endet, kann dann verbunden werden, z. B. über stumpfe Enden, mit dem zurechtgeschnittenen Gen für die reifen

Interferone. Die Gene können in ein Plasmid eingefügt und unter die Kontrolle eines Promoters und seiner zugehörigen Ribosomenbindungsstelle gebracht werden.

In ähnlicher Weise, wie es in Abschnitt K oben beschrieben ist, wurden Genfragmente, die für LeIF C und LeIF B kodieren aufgebaut, zwecks direkter Expression in Bakterien. Bei der Strategie, die zur Expression dieser weiteren Leukozyten-Interferone führte, wurde in jedem Falle auf das etwa 300 Basenpaare-enthaltende Fragment (HindIII-Sau3a), das den trp-Promoter-Operator, die Ribosomenbindungsstelle, das ATG Startsignal und den Cystein-Codon von LeIF A aus PLeIF A25 enthielt, zurückgegriffen. Dieses Fragment wurde kombiniert mit den Fragmenten anderer Interferone, die die entsprechenden Aminosäuresequenzen, die auf den allen gemeinsamen Cysteinrest folgen, kodieren. Jedes erhaltene Plasmid wurde zur Transformation von E. coli K-12 Stamm 294 verwendet.

Für die einzelnen Gene waren folgende Schritte notwendig:

LeIF C

Isolierung der folgenden Fragmente aus pLeIF C:

- (a) ein 35 Basenpaare-enthaltendes Fragment
Sau 3a - Sau 96;
- (b) ein mehr als 900 Basenpaare-enthaltendes
Fragment Sau 96 - Pst I;
- (c) Isolierung eines etwa 300 Basenpaare-ent-

haltenden Fragments (Hind III - Sau3a)
aus pLeIF A-25, wie in Teil K (4) oben be-
schrieben;

- (d) Isolierung des etwa 3600 Basenpaare-ent-
haltenden Fragments aus Abschnitt K (5) oben.

Konstruktion:

(1) Verbindung von (a) mit (c). Spaltung mit BglII,
HindIII und Isolierung des etwa 335 Basenpaare-enthaltenden
Produktes.

(2) Verbindung der unter (1), (b) und (d) erhaltenen
Bruchstücke und Transformierung von E. coli mit dem re-
sultierenden Plasmid.

Ein repräsentativer Klon der auf diese Weise erhalten
wurde, ist E. coli K-12 Stamm 294/pLeIF C trp 35.

LeIF D

Aus pLeIF D wurden isoliert:

- a) ein 35 Basenpaare-enthaltendes Fragment
(Sau3a-AvaII);
- b) ein 150 Basenpaare-enthaltendes Fragment
(AvaII-BglII) und
- c) ein etwa 700 Basenpaare-enthaltendes Fragment
(BglII-PstI).

Aus pLeIF A 25 wurde isoliert:

- d) ein 300 Basenpaare-enthaltendes Fragment
(HindIII-Sau3a).

Aus pBR322 wurde isoliert:

- e) ein etwa 3600 Basenpaare-enthaltendes Fragment
(HindIII-PstI).

Konstruktion

(1) Die Verbindung von (a) mit (b), Spaltung mit BglII und Reinigung liefert ein 185 Basenpaare-enthaltendes Produkt.

(2) Die Verbindung von (1) mit (d), Spaltung mit HindIII und BglII und Reinigung liefert ein etwa 500 Basenpaare enthaltendes Produkt.

(3) Die Fragmente (2), (c) und (e) wurden miteinander verbunden und E. coli mit dem erhaltenen Plasmid transformiert.

Ein in dieser Weise erhaltener repräsentativer Klon ist E. coli K-12 Stamm 294/pLeIF D trp 11.

LeIF F

Bei der Konstruktion eines vollständigen LeIF F Gens und der direkten Expression des entsprechenden Interferons kann man sich die Homologie der Aminosäuren 1-13 zwischen LeIF B und LeIF F zunutze machen. Ein den trp Promotor ent-

haltendes Fragment (A) mit geeignet konstruierten Enden wird aus pHGH207 erhalten, das oben beschrieben ist, über die Behandlung mit Pst I und Xba I und anschließende Isolierung eines ca. 1050 Basenpaaren enthaltenden Fragments. Ein zweites Fragment (B) steht in dem größeren der beiden durch Behandlung des Plasmids pHky 10 mit PstI und BglII entstandenen Fragmente zur Verfügung. Das Fragment A enthält etwa das halbe die Ampicillinresistenz kodierende Gen, während Fragment B den Rest dieses Gens und das vollständige Gen für die Tetracyclinresistenz bis auf den zugehörigen Promotor enthält. Die Fragmente A und B werden mittels T4 Ligase kombiniert und das erhaltene Produkt wird mit XbaI und BglII behandelt, um Dimerisierungen auszuschließen. So entsteht das Fragment (c), welches den trp Promoter-Operator, sowie die Gene für die Tetracyclin- und Ampicillin-Resistenz enthält.

Ein Fragment (d) mit etwa 580 Basenpaaren wird durch Behandlung von pLeIF F mit AvaII und BglII erhalten. Dieses Fragment enthält die Codons für die Aminosäuren 14-166 von LeIF F.

Ein Fragment (e) (49 Basenpaare) wird durch Behandlung von pLeIF B mit XbaI und AvaII erhalten. Dieses Fragment kodiert die Aminosäuren 1-13 von LeIF F.

Die Fragmente (c), (d) und (e) werden in Gegenwart von T4 Ligase miteinander verbunden. Die kohäsiven Enden der entsprechenden Fragmente sind so beschaffen, daß das entstehende Plasmid in der richtigen Weise gebildet wird, wobei das Gen für Tetracyclin-Resistenz unter die Kontrolle des trp Promoter-Operators gebracht wird, zusammen mit dem Gen für reifes LeIF F, so daß die damit transformierten

Bakterien auf Grund ihrer Tetracyclin-Resistenz selektio-
niert werden können. Ein auf diese Weise erhaltener reprä-
sentativer Klon ist E. coli K-12 Stamm 294 pLeIF F trp 1.

LeIF H

Das für die Expression von reifem LeIF H geeignete
Gen kann folgendermaßen hergestellt werden:

1. Plasmid pLeIF H wird der Behandlung mit HaeII und
RsaI unterworfen und ein 816 Basenpaare-enthaltendes Frag-
ment wird isoliert, welches den Bereich von der Aminosäure
10 des Signalpeptids bis zur 3' nicht codierenden Region
kodiert.
2. Das Fragment wird denaturiert und der Reparatursyn-
these mit dem Klenow-Fragment der DNA Polymerase I (Klenow
et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 65, 168 (1970)) unter-
worfen, bei der der synthetische Deoxyribooligonucleotid-
Starter 5'-dATG TGT AAT CTG TCT verwendet wird.
3. Das erhaltene Produkt wird mit Sau3a gespalten und
ein 452 Basenpaare-enthaltendes Fragment, das die Amino-
säuren 1-150 kodiert, wird isoliert.
4. Die Behandlung von pLeIF H mit Sau3a und PstI
und die Isolierung eines 500 Basenpaare-enthaltenden Frag-
ments führt zu einem Gen, das die Aminosäuren 150 bis zum
Ende der Sequenz kodiert.
5. Die in (3) und (4) isolierten Fragmente werden
verbunden zu dem folgenden Fragment

1		166
Met Cys		Asp Stop
ATG TGT..		... GAT TGA—...—Pst I,
	Sau3a,	

das die 166 Aminosäuren des LeIF H kodiert.

6. pLeIF A trp 25 wird zunächst mit XbaI, dann mit DNA Polymerase I und schließlich mit Pst I behandelt. Das resultierende große Fragment kann isoliert und mit dem Produkt aus (5) verbunden werden zu einem Plasmid, mit dem E. coli K-12 Stamm 294 oder ein anderes Bakterium transformiert werden kann, das dann in der Lage ist, reifes LeIF H zu exprimieren.

LeIF I

Die von Lawn et al., (Cell 15, 1157 1978) konstruierte Genbibliothek des menschlichen Genoms im Phagen R Charon 4A wurde nach Leukozyten-Interferon-Genen untersucht, wobei die von Lawn et al. (siehe oben) und Maniatis et al. (Cell 15, 687 (1978)) angegebenen Verfahren verwendet wurden. Eine von der cDNS des LeIF A-Klons abgeleitete radioaktive LeIF-Sonde wurde verwendet, um etwa 5000,000 Plaques zu testen. Sechs LeIF-Klone wurden bei diesem Screening erhalten. Nach nochmaligem Screening und Plaque-Reinigung wurde einer dieser Klone, HLeIF2, für die weitere Analyse ausgewählt.

Unter Verwendung der oben beschriebenen Methode können andere Sonden verwendet werden, um weitere pLeIF-Klone aus dem menschlichen Genom zu isolieren. Diese wiederum können verwendet werden, um weitere Leukozyten-Interferon-Proteine gemäß der vorliegenden Erfindung herzustellen.

1. Das 2000 Basenpaare-enthaltende EcoRI-Fragment des Klon HLeIF2 wurde an der EcoRI-Spaltstelle in pBR325 kloniert. Das resultierende Plasmid LeIF wurde mit EcoRI gespalten und das 2000 Basenpaare-enthaltende Fragment isoliert. Das Deoxyoligonukleotid dAATTCTGCAG (ein EcoRI - PstI-Konverter) wurde an das 2000 Basenpaare-enthaltende EcoRI-Fragment gebunden und das resultierende Fragment mit PstI gespalten, so daß man ein 2000 Basenpaare-enthaltendes Fragment mit PstI-Enden erhielt. Dieses wurde mit Sau96 gespalten und ein Fragment aus 1100 Basenpaaren wurde isoliert, welches ein PstI- und ein Sau96-Ende besaß.

2. Das Plasmid pLeIF C trp 35 wurde mit PstI und XbaI behandelt. Das große Fragment wurde isoliert.

3. Das kleine XbaI - PstI-Fragment aus pLeIF C trp 35 wurde mit XbaI und Sau96 behandelt. Ein 40 Basenpaare-enthaltendes XbaI-Sau96-Fragment wurde isoliert.

4. Die unter (1), (2) und (3) isolierten Fragmente wurden verbunden zu dem Plasmid pLeIF I trp 1.

LeIF J

1. Das Plasmid pLeIF J enthält ein aus 3800 Basen bestehendes HindIII-Fragment des menschlichen Genoms, welches die LeIF J Gensequenz umfaßt. Ein 760 Basenpaare-enthaltendes DdeI - RsaI-Fragment wurde aus diesem Plasmid isoliert.

2. Das Plasmid pLeIF B trp 7 wurde mit HindIII und DdeI gespalten und ein 340 Basenpaare-enthaltendes HindIII-DdeI-Fragment isoliert.

3. Das Plasmid pBR322 wurde mit PstI gespalten, die Enden wurden abgespalten durch Inkubation mit DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) und schließlich wurde mit HindIII behandelt. Das große, etwa 3600 Basenpaare-enthaltende Fragment wurde isoliert.

4. Die Fragmente aus (1), (2) und (3) wurden miteinander verbunden zu dem Plasmid pLeIF J trp 1.

M. Reinigung

Der Leukozyten-Interferon-Gehalt von Bakterienextrakten kann durch die folgenden Maßnahmen in der angegebenen Reihenfolge erhöht werden:

1. Polyethylenimin-fällung, bei der der größte Teil der cellulären Proteine, einschließlich des Interferons, im Überstand verbleibt.

2. Ammoniumsulfatfraktionierung, wobei das Interferon bei einer Sättigung von 55 % mit Ammoniumsulfat aus der Lösung ausfällt.

3. Suspendierung des Ammoniumsulfatkuchens in 0,06 M Kaliumphosphat, 10 mM Tris-HCl (pH 7,2) und Dialyse gegen 25 mM Tris-HCl (pH 7,9), wobei die Interferonaktivität in der Lösung bleibt.

4. Chromatographie des Überstandes, auf ein pH von 8,5 eingestellt, an einer DEAE-Cellulose-Säule (Elution mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0,2 M NaCl in 25 mM Tris-HCl, pH 8,5).

5. Adsorption an Cibachrom Blau-Agarose bzw. Hydroxylapatit und Elution mit 1,5 M KCl bzw. 0,2 M Phosphatlösung (fakultativ).

6. Fraktionierung an einer Sephadex [®] G-75 Säule.

7. Kationenaustauschchromatographie an CM-Cellulose in 25 mM Ammoniumacetat bei pH 5,0 mit einem Ammoniumacetatgradienten (bis zu 0,2 M Ammoniumacetat).

Nach dem vorstehend angegebenen Verfahren erhält man ein Material von einer Reinheit mit über 95 %.

Das Material kann auch gereinigt werden durch Größenausschluß-Chromatographie, HPLC an umgekehrten Phasen (RP-8) oder Affinitätschromatographie an immobilisierten Antiinterferon-Antikörpern.

Ferner kann das nach Absatz 4 oben erhaltene Material auf eine Säule monoklonaler Antikörper gebracht werden, die, wie von Milstein in Scientific American 243, 66 (1980) beschrieben, hergestellt wird und mit 0,2 M Essigsäure, 0,1 % Triton und 0,15 M NaCl eluiert werden.

In einem anderen, bevorzugten Verfahren kann das erfindungsgemäße erhaltene Interferon folgendermaßen gereinigt werden:

1. Gebrorenes Zellmaterial wird mechanisch zerkleinert. Die teilweise aufgetauten Zellen werden in dem vierfachen Volumen des Puffers A, enthaltend 0,1 M Tris (pH 7,5-8,0), pH 7,5-8,0), 10 % (w/v) Saccharose, 0,2 M NaCl, 5mM EDTA, 0,1 mM PMSF und 10-100 mM $MgCl_2$, suspendiert. Die Suspension wird dann 2 x bei 4 °C unter einem Druck von etwa 400 und weniger als 70 Atmosphären durch einen Homogenisator gegeben und schließlich in einem Eisbad gekühlt.
2. Dem Homogenisat wird langsam Polyethylenimin bis zu einer Konzentration von etwa 0,35 % zugesetzt. Das Gemisch wird stehengelassen und die Feststoffe werden durch Zentrifugieren und Filtration getrennt. Bei diesem Schritt wird die Temperatur unter 10 °C gehalten. Der Überstand (bzw. das Filtrat) wird durch Ultrafiltration auf etwa ein Zehntel des ursprünglichen Volumens konzentriert. Die Lösung wird notfalls noch einmal durch eine mikroporöse Membran filtriert.
3. Die klare Lösung wird direkt auf eine Säule monoklonaler Antikörper bei einer Durchflußrate von 5-8 cm/Stunde (z. B. 25-40 ml pro Stunde bei einem Säulendurchmesser von 2,6 cm) gegeben. Es wird mit dem etwa zehnfachen Säulenvolumen einer Lösung, die 25 mM Tris-HCl (pH 7,5-8,5), 0,5 M NaCl und 0,2 % eines Detergenzes, wie Triton X-100 enthält, gewaschen. Anschließend wird mit dem etwa zehnfachen Säulenvolumen einer Lösung, die 0,15 M NaCl und 0,1 % eines Detergenzes, wie Triton X-100, enthält gespült. Die Säule wird dann mit 0,2 M Essigsäure, enthaltend 0,1 % eines Detergenzes, wie Triton X-100, eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen werden zusammengefaßt und

mit 1 N NaOH oder 1,0 M Tris-Base auf einen pH von etwa 4,5 gebracht.

4. Diese Fraktion wird dann auf einen Kationenaustauscher, beispielsweise Whatmann CM52-Cellulose, der vorher mit einem geeigneten Puffer, beispielsweise Ammoniumacetat, pH 4,5 (50 mM), äquilibriert wurde, gebracht. Es wurde dann mit dem Puffer so lange gewaschen, bis die UV-Absorption im Eluat konstant war. Die Säule wurde dann mit 25 mM Ammoniumacetat/0,12 M Natriumchlorid eluiert und das Eluat wurde in üblicher Weise aufgearbeitet.

Die in der bevorzugten Ausführungsform verwendeten monoklonalen Antikörper können nach dem von Staehelin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1848-52 (1981) beschriebenen Verfahren hergestellt werden. Die Reinigung und Bindung der monoklonalen Antikörper an Affigel-10 wird im folgenden beschrieben.

Gewinnung und Reinigung monoklonaler Antikörper aus Aszites-Flüssigkeit

Fünf weibliche Balb/c Mäuse wurden jeweils mit $5 \cdot 10^6$ Hybridomzellen aus der Mitte der logarithmischen Wachstumsphase inokuliert. Weitere Mäuse (10 oder mehr) wurden jeweils mit $5 \cdot 10^6$ lebensfähigen Zellen, die aus der von inokulierten Mäusen hergestellten Flüssigkeit gewonnen wurden, intraperitoneal inokuliert.

Die Aszites-Flüssigkeit jeder Maus wurde gesammelt. Die Flüssigkeit wurde zunächst 15 Minuten mit 500-1000 x g und dann 90 Minuten mit 18000 Umdrehungen pro Minute

zentrifugiert. Der Überstand wurde gefroren und bei -20°C aufbewahrt. Nach dem Auftauen wurde weiteres festes Material durch 90 minütiges Zentrifugieren mit 35000 Umdrehungen pro Minute entfernt. Die von jeder Maus erhaltenen einzelnen Batches wurden auf spezifische Antikörperaktivität nach einem Festphasenantikörperbindungstest (Staehelin et al., siehe oben) getestet und, wenn möglich, zusammengefaßt.

Die Proteinkonzentrationen der Lösungen wurden annäherungsweise bestimmt, wobei man davon ausging, daß in einer 1 cm-Küvette 1 mg Protein eine Absorption von 1,2 bei 280 nm lieferte. Aszites-Flüssigkeiten mit einem hohen Antikörpergehalt enthielten 30-35 mg Protein/ml. Dies entspricht etwa 4-7 mg spezifischem Antikörper/ml. Die Flüssigkeit wurde verdünnt mit PBS (0,01 M Natriumphosphat, pH 7,3, 0,15 M NaCl) auf eine Proteinkonzentration von 10-12 mg/ml.

Zu je 100 ml der verdünnten Lösungen wurden bei 0°C unter starkem Rühren langsam 90 ml von bei Zimmertemperatur gesättigter Ammoniumsulfatlösung gegeben. Die Suspension wurde während 40-70 Minuten in Eis aufbewahrt, dann während 15 Minuten bei 4°C mit 10.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Der Proteinkuchen wurde in 0,02 M Tris-HCl (pH 7,9)/0,04 M NaCl (Puffer I) gelöst und die Proteinlösung während 16-18 Stunden bei Raumtemperatur gegen 100 Volumina des Puffers I dialysiert. Die dialysierte Lösung wurde 10 Minuten mit 15.000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Etwa 30-35 % des ursprünglichen Gesamtproteingehalts der Aszites-Flüssigkeit wurde wiedergefunden mittels Messung der Absorption bei 280 nm.

Eine Lösung, enthaltend 30-40 mg Protein/ml wurde dann auf eine DEAE-Cellulosesäule, die mit Puffer I äquibriert war, gegeben, wobei für jeweils 1 g Protein mindestens ein Säulenvolumen von 100 ml verwendet wurde. Der Antikörper wurde von der Säule mit einem linearen NaCl-Gradienten (0,04 M - 0,5 M) in 0,02 M Tris-HCl (pH 7,9) eluiert. Die Fraktionen mit einem NaCl-Gehalt von 0,06-0,1 M wurden zusammengefaßt, konzentriert und mit bei Zimmertemperatur gesättigter Ammoniumsulfatlösung versetzt. Es wurde zentrifugiert, der Proteinkuchen wurde in 0,2 M NaHCO_3 (pH etwa 8,0)/0,3 M NaCl (Puffer II) gelöst und bei Raumtemperatur gegen diesen Puffer dialysiert. Die dialysierte Lösung wurde 15 Minuten lang mit 20.000 x g zentrifugiert und der Proteingehalt wurde auf 20-25 mg/ml mit Puffer II eingestellt.

Herstellung von Immunadsorbentien

Affigel-10 (BioRad Laboratories, Richmond, Kalifornien) wurde auf einem gesinterten Glasfilter dreimal mit eiskaltem Isopropanol und dreimal mit eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen. Das Gel, das noch etwa 50 % Wasser enthielt, wurde in Plastikröhrchen übergeführt und durch kurzes Zentrifugieren sedimentiert. Der Überstand wurde verdunstet. Das gepackte Gel wurde mit einem gleichen Volumen gereinigter Antikörperlösung gemischt und während 5 Stunden bei 4 °C Ende-über-Ende rotieren gelassen. Nach der Reaktion wurde das Gel zentrifugiert und zweimal mit Puffer III (0,1 M NaHCO_3 /0,15 M NaCl) gewaschen, um nicht-gebundene Antikörper zu entfernen. Die Proteinbestimmung zeigte, daß mehr als 90 % des Antikörpers an das Gel gebunden worden war.

Um noch freie, reaktive Bindungsstellen abzusättigen, wurde das Gel mit einem gleichen Volumen 0,1 M Ethanolamin-HCl (pH 8) gemischt und während 60 Minuten bei Raumtemperatur Ende-über-Ende rotieren gelassen. Schließlich wurde das Gel mit PBS gewaschen und bei 4 °C in PBS in Gegenwart von 0,02 % (w/v) Natriumazid aufbewahrt.

N. Parenterale Applikation

LeIF kann parenteral verabreicht werden an Individuen, die eine Antitumor- oder antivirale Behandlung benötigen und an solche, die immunsuppressive Zustände aufweisen. Die Dosierung der erfindungsgemäßen Interferone kann sich an die des zur Zeit in klinischer Prüfung befindlichen Materials, das aus menschlichen Leukozyten gewonnen wurde, anlehnen und kann z. B. etwa $1-10 \times 10^6$ Einheiten pro Tag, im Fall von Material mit einer Reinheit, die größer ist als 1 %, bis zu etwa 5×10^7 Einheiten pro Tag betragen.

Ein für die parenterale Applikation geeignetes Präparat kann beispielsweise dadurch hergestellt werden, daß man 3 mg bakteriell hergestelltes LeIF mit einer spezifischen Aktivität von etwa 2×10^8 Einheiten pro mg in 25 ml 5 N humanem Serumalbumin löst, die Lösung durch ein bakteriologisches Filter gibt und die filtrierte Lösung aseptisch in 100 Ampullen abfüllt, von denen jede 6×10^6 Einheiten reines Interferon enthält. Die Ampullen werden vorzugsweise in der Kälte (-20 °C) aufbewahrt.

Die Herstellung pharmazeutischer Präparate, die erfindungsgemäße Verbindungen enthalten, kann nach den allgemein bekannten Methoden der Galenik unter Verwendung der üblichen Hilfs- und Trägermaterialien, wie sie in der einschlägigen Literatur beschrieben sind, erfolgen.

Erfindungsanspruch

1. Verfahren zur Herstellung eines replikablen, in einem Mikroorganismus die Expression eines Polypeptids mit der Aminosäuresequenz eines reifen Human-Leukozyten-Interferone bewirkenden Vektors; gekennzeichnet dadurch, daß man eine dieses Polypeptid codierende erste DNS-Sequenz operabel mit einer zweiten DNS-Sequenz, die die für die Expression notwendigen Codons enthält, verbindet.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die zweite DNS-Sequenz die Expression in einem Bakterium bewirkt.
3. Verfahren nach Punkt 2, gekennzeichnet dadurch, daß das Bakterium E. coli ist.
4. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß das Polypeptid die Aminosäuresequenz eines aminoendständig um Methionin verlängerten reifen Human-Leukozyten-Interferons besitzt.
5. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß das Polypeptid die Aminosäuresequenz eines aminoendständig um ein abspaltbares Konjugat oder ein mikrobielles Signalprotein verlängertes reifes Human-Leukozyten-Interferon besitzt.
6. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß das Polypeptid die Aminosäurepartialsequenz Cys-Ala-Trp-Glu-Val-Val-Arg-Ala-Glu-Ile-Met-Arg-Ser enthält.

7. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß das Polypeptid die in Fig. 4 in Zeile "All" angegebenen Aminosäuren an den angegebenen Stellen der Aminosäuresequenz enthält.
8. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß das Polypeptid Human-Leukozyten-Interferon (LeIF) A, B, C, D, F, H, I oder J ist.
9. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß Human-Leukozyten-Interferon A (LeIF A) exprimiert wird.
10. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß Human-Leukozyten-Interferon B (LeIF B) exprimiert wird.
11. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß Human-Leukozyten-Interferon C (LeIF C) exprimiert wird.
12. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß Human-Leukozyten-Interferon D (LeIF D) exprimiert wird.
13. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß Human-Leukozyten-Interferon F (LeIF F) exprimiert wird.
14. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß Human-Leukozyten-Interferon H (LeIF H) exprimiert wird.

15. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß Humen-Leukozyten-Interferon I (LeIF I) exprimiert wird.
16. Verfahren nach einem der Punkte 1 bis 3, gekennzeichnet dadurch, daß Human-Leukozyten-Interferon J (LeIF J) exprimiert wird.

Hierzu 10 Seiten Zeichnungen

TRYPTISCHES PEPTID (T-1)

TRYPTISCHES PEPTID (T-13)

Ala-Glu-Ile-Met-Arg

His-Glu-Met-Ile-Gln---

PROTEIN

5' GCN GA^A AUC AUG A^A CAG^A U

5' CA^C U GA^A AUG AUC CA^A G

mRNA

3' CTT TAG TAC GC (T-1A)

3' GTA CTT TAC TA (T-13A)

KOMPLEMENTAERE

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

--G----- (T-13B)

DNA STARTER

--T----- (T-1C)

--C----- (T-13C)

--T----- (T-1D)

--G----- (T-13D)

Fig. 1

^{32}P -T-1C Sonde

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

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

 ^{32}P -T-13C Sonde

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

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

Fig. 2

	S1	S10	S20	S23	10	20	30	40
Leif A	MALTFALLVALLVLSCKSSCSVGGCCDLPPQTHSLGSRRTLLMLLAQMRRIISLFSCLKDRHDFGFPQ							
Leif B	MALTFYLLMVALVLSYKSSCSLGGCCDLPPQTHSLGNRRRAILLGQMRRIISLFSCLKDRHDFGFPQ							
Leif C	MALSFSLMVALVLSYKSSCSLGGCCDLPPQTHSLGNRRRAILLGQMRRIISLFSCLKDRHDFGFPQ							
Leif D	MALSPFALLMVALVLSYKSSCSLGGCCDLPPQTHSLGNRRRAILLGQMRRIISLFSCLKDRHDFGFPQ							
Leif E	MALSFSLMVALVLSYKSSCSLGGCCDLPPQTHSLGNRRRAILLGQMRRIISLFSCLKDRHDFGFPQ							
Leif F	MALSFSLMVALVLSYKSSCSLGGCCDLPPQTHSLGNRRRAILLGQMRRIISLFSCLKDRHDFGFPQ							
Leif G	MALPFSLMVALVLSYKSSCSLGGCCDLPPQTHSLGNRRRAILLGQMRRIISLFSCLKDRHDFGFPQ							
Leif H	MALPFSLMVALVLSYKSSCSLGGCCDLPPQTHSLGNRRRAILLGQMRRIISLFSCLKDRHDFGFPQ							
All	MA F L VLS KS S GC L THSL RR L L QM IS SCL RHDE PQ							
Leif A	EEF-GNQQFQKAAETIPVVLHHEMIQQIFNLFSTYKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQQLNDLEACV IQG							
Leif B	EEFDGKQFQKAAETIPVVLHHEMIQQIFNLFSTYKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQQLNDLEACV IQG							
Leif C	EEFDGKQFQKAAETIPVVLHHEMIQQIFNLFSTYKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQQLNDLEACV IQG							
Leif D	EEFDGKQFQKAAETIPVVLHHEMIQQIFNLFSTYKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQQLNDLEACV IQG							
Leif E	EEFDGKQFQKAAETIPVVLHHEMIQQIFNLFSTYKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQQLNDLEACV IQG							
Leif F	EEFDGKQFQKAAETIPVVLHHEMIQQIFNLFSTYKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQQLNDLEACV IQG							
Leif G	EEFDGKQFQKAAETIPVVLHHEMIQQIFNLFSTYKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQQLNDLEACV IQG							
Leif H	EEFDGKQFQKAAETIPVVLHHEMIQQIFNLFSTYKDS SAAWDETL LDKFYTELYQQQLNDLEACV IQG							
All	EEFD QFQKA I VLHE QQ FNL F Y SSA LL F EL QQ ND E Q							
Leif A	VGVTETPLMKEDSILAVRKYFFQRIITLYLKEKKYSSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE							
Leif B	VGVTETPLMKEDSILAVRKYFFQRIITLYLKEKKYSSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE							
Leif C	VGVTETPLMKEDSILAVRKYFFQRIITLYLKEKKYSSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE							
Leif D	ERVGETPLMNVDSILAVRKYFFQRIITLYLKEKKYSSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE							
Leif E	VGVEETPLMNVDSILAVRKYFFQRIITLYLKEKKYSSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE							
Leif F	VGVEETPLMNVDSILAVRKYFFQRIITLYLKEKKYSSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE							
Leif G	VGVEETPLMNVDSILAVRKYFFQRIITLYLKEKKYSSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE							
Leif H	VGVEETPLMNVDSILAVRKYFFQRIITLYLKEKKYSSPCAWEVVRAEIMRSFSLSTNLQESLRSKE							
All	V PLM DSIL V KYF RITLYL E KYS CAWEV VRAEIMRS S S Q L K							

Fig. 4

Basenpaare 0 200 400 600 800 1000

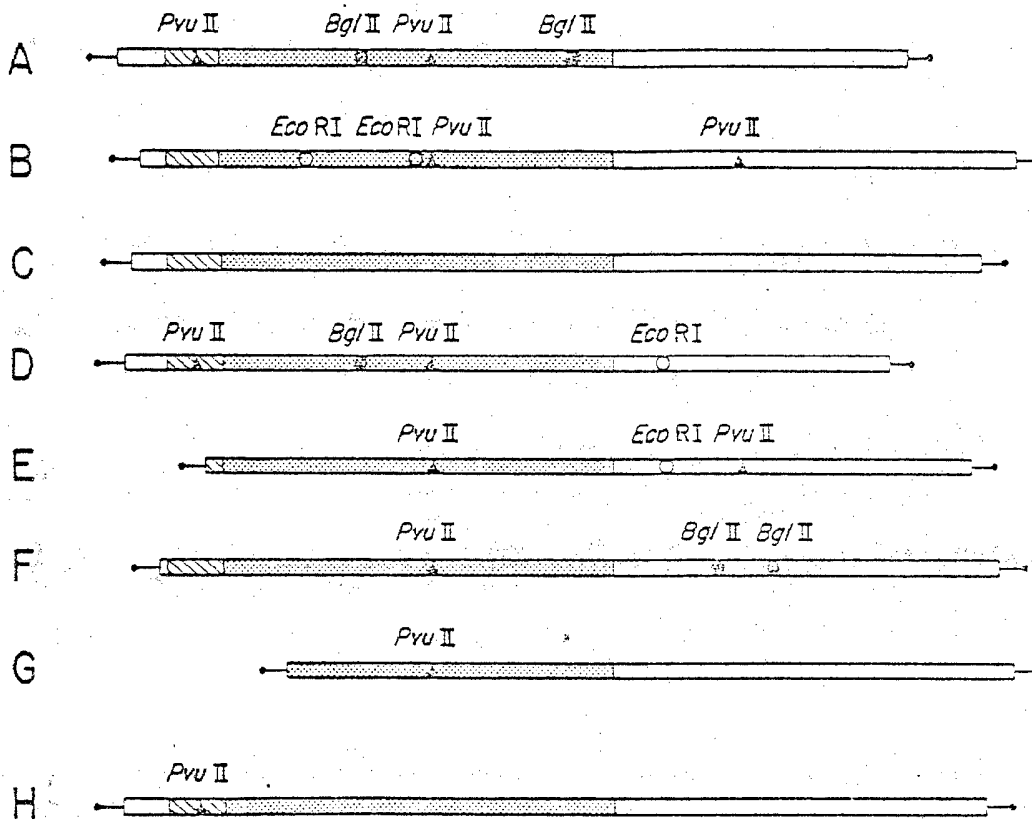


Fig. 5

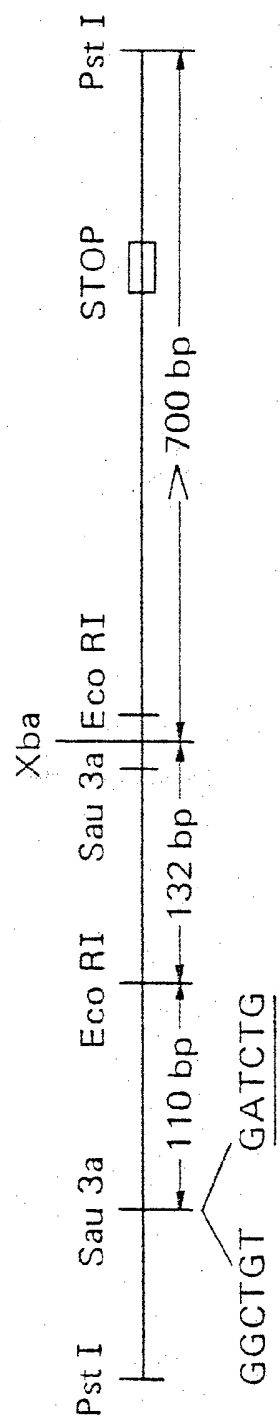


Fig. 7a

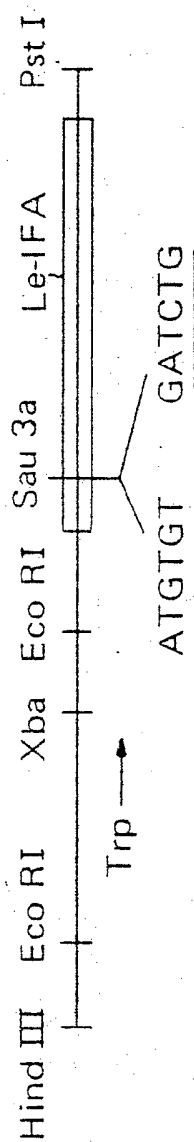


Fig. 7b

A
H
I
J
C

GTATGTTCCCTA
GTATGTTCCCTA
GTATGTTCCCTA
GTATGTTCCCTA
GTATGTTCCCTA

A
H
I
J
C

TTTAAGGC-TAGGCACAAAGCAAGGTCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCACCATT-TCAACCAAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA
TTTAAGGC-TAGGCACAAAGCAAGGTCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCACCATT-TCAACCAAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA
TTTAAGGC-TAGGCACAAAGCAAGGTCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCACCATT-TCAACCAAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA
TTTAAGGC-TAGGCACAAAGCAAGGTCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCACCATT-TCAACCAAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA
TTTAAGGC-TAGGCACAAAGCAAGGTCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCACCATT-TCAACCAAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA
TTTAAGGC-TAGGCACAAAGCAAGGTCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCACCATT-TCAACCAAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA

+1

A
H
I
J
C

ATGCGCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGTCTAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCGCTCAAACCCACAGCCTGGGTA
ATGCGCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGTCTAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCGCTCAAACCCACAGCCTGGGTA
ATGCGCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGTCTAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCGCTCAAACCCACAGCCTGGGTA
ATGCGCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGTCTAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCGCTCAAACCCACAGCCTGGGTA
ATGCGCTTGACCTTTGCTTTACTGGTGGCCCTCCTGGTGTCTAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCGCTCAAACCCACAGCCTGGGTA

100

A
H
I
J
C

GCAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCAGAGTGGAGGAAATCTCTCTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCGAGGAGGAGTTT--
ACAGGAGGACCTTGATGCTCCTGGCAGAGTGGAGGAAATCTCTCTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCGAGGAGGAGTTTGA
ATAGGAGGAGGAGCTTGATGCTCCTGGCAGAGTGGAGGAAATCTCTCTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCGAGGAGGAGTTTGA
ATAGGAGGAGGAGCTTGATGCTCCTGGCAGAGTGGAGGAAATCTCTCTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCGAGGAGGAGTTTGA
ATAGGAGGAGGAGCTTGATGCTCCTGGCAGAGTGGAGGAAATCTCTCTTTCTCCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCGAGGAGGAGTTTGA

200

A
H
I
J
C

-GGCAACCAAGTTCACAAAGGCTGAAACCATCCCTGCTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAGGAGCTCATCTGCTGCTGG
TGCAACCAAGTTCACAAAGGCTGAAACCATCCCTGCTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAGGAGCTCATCTGCTGCTGG
TGCAACCAAGTTCACAAAGGCTGAAACCATCCCTGCTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAGGAGCTCATCTGCTGCTGG
TGCAACCAAGTTCACAAAGGCTGAAACCATCCCTGCTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAGGAGCTCATCTGCTGCTGG
TGCAACCAAGTTCACAAAGGCTGAAACCATCCCTGCTCCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAGGAGCTCATCTGCTGCTGG

300

A
H
I
J
C

GATGAGACCTCCTAGACAAATTTCTACTGAACTTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCC
GATGAGACCTCCTAGACAAATTTCTACTGAACTTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCC
GATGAGACCTCCTAGACAAATTTCTACTGAACTTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCC
GATGAGACCTCCTAGACAAATTTCTACTGAACTTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCC
GATGAGACCTCCTAGACAAATTTCTACTGAACTTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGGTGGGGGTGACAGAGACTCCCC

400

A
H
I
J
C

TGATGAAGGAGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATCTTCCAAAGAAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGT
TGATGAAGGAGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATCTTCCAAAGAAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGT
TGATGAAGGAGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATCTTCCAAAGAAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGT
TGATGAAGGAGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATCTTCCAAAGAAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGT
TGATGAAGGAGGACTCCATCTGGCTGTGAGGAAATCTTCCAAAGAAATCACTCTCTATCTGAAAGAGAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGT

500

A
H
I
J
C

CAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTTCAACAAACTTGCAAGAAAGTTTAAAGAGTAAAGGATGAAAGTGGTTCAACATGGAATGATTTTCAT
CAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTTCAACAAACTTGCAAGAAAGTTTAAAGAGTAAAGGATGAAAGTGGTTCAACATGGAATGATTTTCAT
CAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTTCAACAAACTTGCAAGAAAGTTTAAAGAGTAAAGGATGAAAGTGGTTCAACATGGAATGATTTTCAT
CAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTTCAACAAACTTGCAAGAAAGTTTAAAGAGTAAAGGATGAAAGTGGTTCAACATGGAATGATTTTCAT
CAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTTCAACAAACTTGCAAGAAAGTTTAAAGAGTAAAGGATGAAAGTGGTTCAACATGGAATGATTTTCAT

600

A
H
I
J
C

TGATTCGATGCCAGCTCAGCTTTTATGATCTGCCATTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTATGACCATGACACGATTTAAATCTTTTCAAAATGTTTTAG
TGATTCGATGCCAGCTCAGCTTTTATGATCTGCCATTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTATGACCATGACACGATTTAAATCTTTTCAAAATGTTTTAG
TGATTCGATGCCAGCTCAGCTTTTATGATCTGCCATTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTATGACCATGACACGATTTAAATCTTTTCAAAATGTTTTAG
TGATTCGATGCCAGCTCAGCTTTTATGATCTGCCATTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTATGACCATGACACGATTTAAATCTTTTCAAAATGTTTTAG
TGATTCGATGCCAGCTCAGCTTTTATGATCTGCCATTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTATGACCATGACACGATTTAAATCTTTTCAAAATGTTTTAG

700

A
H
I
J
C

SAGTATTAAACACATTTGATTCAGCTCTTAAAGGCACTAGTCCCTTACAGAGGACCATGCTGACTGATCCATTATCTATTTAAATATTTTAAATATTA
SAGTATTAAACACATTTGATTCAGCTCTTAAAGGCACTAGTCCCTTACAGAGGACCATGCTGACTGATCCATTATCTATTTAAATATTTTAAATATTA
SAGTATTAAACACATTTGATTCAGCTCTTAAAGGCACTAGTCCCTTACAGAGGACCATGCTGACTGATCCATTATCTATTTAAATATTTTAAATATTA
SAGTATTAAACACATTTGATTCAGCTCTTAAAGGCACTAGTCCCTTACAGAGGACCATGCTGACTGATCCATTATCTATTTAAATATTTTAAATATTA
SAGTATTAAACACATTTGATTCAGCTCTTAAAGGCACTAGTCCCTTACAGAGGACCATGCTGACTGATCCATTATCTATTTAAATATTTTAAATATTA

800

A
H
I
J
C

TTTATTTAACTATTTATAAACAACCTTATTTTGTTCATATTATGTCATGTGCACCTTTGCACAGTGGTTAATGTAATAAATATGTTCTTTGATTTGG
TTTATTTAACTATTTATAAACAACCTTATTTTGTTCATATTATGTCATGTGCACCTTTGCACAGTGGTTAATGTAATAAATATGTTCTTTGATTTGG
TTTATTTAACTATTTATAAACAACCTTATTTTGTTCATATTATGTCATGTGCACCTTTGCACAGTGGTTAATGTAATAAATATGTTCTTTGATTTGG
TTTATTTAACTATTTATAAACAACCTTATTTTGTTCATATTATGTCATGTGCACCTTTGCACAGTGGTTAATGTAATAAATATGTTCTTTGATTTGG
TTTATTTAACTATTTATAAACAACCTTATTTTGTTCATATTATGTCATGTGCACCTTTGCACAGTGGTTAATGTAATAAATATGTTCTTTGATTTGG

900

A
H
I
J
C

TAAATTTATTTTGTGTTGTTCACTTGAACCTTTGCTATGGAACCTTTGCTATGTTTATTTCTTTTAAATGAAATTCAGGCTTAAATGGAACCTGATTA
TAAATTTATTTTGTGTTGTTCACTTGAACCTTTGCTATGGAACCTTTGCTATGTTTATTTCTTTTAAATGAAATTCAGGCTTAAATGGAACCTGATTA
TAAATTTATTTTGTGTTGTTCACTTGAACCTTTGCTATGGAACCTTTGCTATGTTTATTTCTTTTAAATGAAATTCAGGCTTAAATGGAACCTGATTA
TAAATTTATTTTGTGTTGTTCACTTGAACCTTTGCTATGGAACCTTTGCTATGTTTATTTCTTTTAAATGAAATTCAGGCTTAAATGGAACCTGATTA
TAAATTTATTTTGTGTTGTTCACTTGAACCTTTGCTATGGAACCTTTGCTATGTTTATTTCTTTTAAATGAAATTCAGGCTTAAATGGAACCTGATTA

1,000

Fig. 8

30 SEP 1983 * 119645

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

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

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

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

	130		140		150		160																														
A	Y	L	K	E	K	K	Y	S	P	C	A	W	E	V	Y	R	A	E	I	M	R	S	F	S	L	S	T	N	L	Q	E	S	L	R	S	K	E
H	Y	L	M	E	K	K	Y	S	P	C	A	W	E	V	Y	R	A	E	I	M	R	S	L	S	F	S	T	N	L	Q	K	R	L	R	R	K	D
I	Y	L	T	E	K	K	Y	S	P	C	A	W	E	V	Y	R	A	E	I	M	R	S	L	S	F	S	T	N	L	Q	K	I	L	R	R	K	D
J	Y	L	M	E	K	K	Y	S	P	C	A	W	E	V	Y	R	A	E	I	M	R	S	F	S	F	S	T	N	L	K	K	G	L	R	R	K	D
C	Y	L	I	E	R	K	Y	S	P	C	A	W	E	V	Y	R	A	E	I	M	R	S	L	S	F	S	T	N	L	Q	K	R	L	R	R	K	D

Fig. 9