

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGESESSKRIFT

(11) 164108 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 3144/85	(51) Int.Cl.5	C 07 K 13/00
(22) Indleveringsdag: 10 jul 1985		C 07 K 15/26
(41) Alm. tilgængelig: 12 jan 1986		C 12 N 15/23
		C 12 N 15/70
(44) Fremlagt: 11 maj 1992		
(86) International ansøgning nr.: -		
(83) Deponering af mikroorganismer		
(30) Prioritet: 11 jul 1984 JP 143950/84		
(71) Ansøger: *Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.; 6-1, Ohtemachi Itchome; Chiyoda-ku; Tokyo, JP		
(72) Opfinder: Seiga *Itoh; JP, Yasutoshi *Takeichi; JP, Moriyuki *Sato; JP		

(74) Fuldmægtig: Hofman-Bang & Boutard A/S

(54) Derivat af humant interferon-gamma-polypeptid, rekombinant plasmid til brug ved fremstilling deraf, fremgangsmåde til fremstilling deraf og mikroorganisme indeholdende rekombinant plasmid

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 6108/84
EP off.g.skrift nr. 95350

(57) Sammendrag: 3144-85

Et hidtil ukendt derivat af humant IFN- γ polypeptid, hvori visse aminosyrer af humant IFN- γ polypeptid er fjernet, og visse aminosyrer forskellige fra de nævnte er erstattet med andre aminosyrer. Derivaterne har høj IFN- γ aktivitet og forventes at blive nyttige som lægemidler i antivirale og antitumor-midler.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Opfindelsen angår et derivat af et humant interferon- γ -polypeptid ifølge krav 1, der kodes af et rekombinant plasmid ifølge krav 1 og 2. Opfindelsen angår endvidere en mikroorganisme ifølge krav 3, der er transformeret med et sådant rekombinant plasmid. Endelig angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af et derivat af humant interferon- γ -polypeptid ifølge krav 4.

Interferoner (i det følgende betegnet IFN) kan så vidt vides klassificeres i tre grupper, nemlig IFN- α , IFN- β og IFN- γ . IFN- α dannes hovedsageligt ud fra leukocyter, IFN- β ud fra fibroblaster og IFN- γ ud fra T-lymfocytter. Disse IFN'er er blevet beskrevet som biologisk aktive stoffer med antiviral aktivitet, aktiverende aktivitet på naturlige killer-celler og makrofager, antitumoraktivitet og lignende.

Hvad angår IFN- γ , er det rapporteret, at det har en stærkere celleinhiberende aktivitet end andre IFN'er, baseret på det eksperiment, der gør brug af dyreceller [B.Y. Rubin og S.L. Gupta: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 5928-5932 (1980)]. Endvidere er kloning af en IFN- γ -cDNA og bestemmelse af dens basesekvens for nylig rapporteret [P.W. Gray, et al., Nature 295, 503 (1982); R. Devos, et al., Nucleic Acids Research 10, 2487 (1982)].

Ved opfindelsen har man nu uafhængigt klonet en cDNA kodende for et hidtil ukendt IFN- γ , hvori, som det fremgår af basesekvensen som vist i tabel 1, den 9. aminosyre af det modne IFN- γ rapporteret af Devos et al., lysin (Lys) (AAA), er erstattet med glutamin (Gln) (CAA). Endvidere blev IFN- γ -cDNA'en inkorporeret i vektor pKYP-10, der har en tryptophanpromoter (japansk offentliggjort, uundersøgt patentansøgning nr. 110600/83), og masseproduktion af IFN- γ er opnået i Escherichia coli.

Derefter har opfinderne af den foreliggende opfindelse undersøgt dannelsen af derivater af IFN- γ -polypeptid under anvendelse af den i tabel 1 viste IFN- γ -cDNA som udgangsmateriale.

5

Det blev rapporteret, at deletion af 11 aminosyrer fra den C-terminale ende af α -IFN nedsatte den specifikke aktivitet til 1/3 [A.E. Franke, et al., DNA 1, 223-230 (1982)], hvorimod addition af 18 aminosyrer til den N-terminale ende af α -IFN ikke ændrede den specifikke aktivitet [R.M. King, et al., J. Gen. Virol. 64, 1815-1818 (1983)].

Opfinderne af den foreliggende opfindelse har fundet, at deletion af 5 aminosyrer fra den N-terminale ende af Hepatitis B virus nedsatte den specifikke aktivitet til ca. 1/100 [T. Nishi, et al., DNA 2, 265-273 (1983)], og addition af 7 aminosyrer til den N-terminale ende af Hepatitis B virus nedsatte den specifikke aktivitet til ca. 1/10 [S. Itoh, et al., DNA 3, 157-165 (1984)].

I EP offentliggørelsesskrift nr. 95 350 beskrives et humant IFN- γ -lignende polypeptid, hvis aminosyresekvens er angivet på side 2 i EP offentliggørelsesskrift nr. 95 350. Aminosyrerestene på position 9 er en Lys-rest (derivaterne i nærværende opfindelse har en Gln-rest på position 9).

EP offentliggørelsesskrift nr. 146 944 (DK patentansøgning nr. 6108/84, tilhørende ansøgeren), der er et dokument under Art. 54(3) EPC, beskriver fem derivater af det humane IFN- γ -polypeptid. Alle har de en carboxylterminus, der er identisk med det naturligt forekommende humane IFN- γ . Disse derivater er derfor forskellige fra derivaterne ifølge opfindelsen, der har en deletion af aminosyrepositionerne 138-146.

Opfinderne af den foreliggende opfindelse har konstrueret et derivat af IFN- γ , hvori den 3. aminosyre i IFN- γ som vist i tabel 1, cystein (Cys), var erstattet med tyrosin (Tyr) (i det følgende kaldt 3-Tyr-IFN- γ), og fundet, at
5 den specifikke aktivitet var 2 til 4 gange så stærk som aktiviteten af moder-IFN- γ . Endvidere konstruerede man de derivater, hvori Cys i stilling 1 var erstattet med serin (Ser) (1-Ser-IFN- γ), Cys i stilling 3 var erstattet med Ser (3-Ser-IFN- γ), Cys i stilling 1 og 3 var erstattet
10 med Ser (1,3-Ser-IFN- γ), og N-terminale aminosyrer i IFN- γ vist i tabel 1 var deleteret. Ækvivalent eller større interferonaktivitet blev detekteret for alle derivaterne sammenlignet med udgangs-IFN- γ .

15 Det har været kendt, at modent murint IFN- γ består af 136 aminosyrer, hvilket antal er 10 mindre end antallet af aminosyrer i humant IFN- γ , og det er mere varmestabilt end humant IFN- γ . Murint IFN- γ har Cys i position 136 såvel som i position 1 og 3, og disse Cys danner disulfidbindinger i molekylet, hvilket betragtes som bidragende
20 til stabilisering af IFN [D. Goeddel, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 80, 5842-5846 (1984)].

Opfinderne af den foreliggende opfindelse har fremstillet
25 molekylmodellen af IFN- γ og antaget, at dannelsen af disulfidbinding i molekylet for humant IFN- γ var mulig ved indføring af Cys mellem position 135 og 138 fra den N-terminale ende, foretrukket i position 137. Adskillige derivater af IFN- γ , hvori C-terminale aminosyrer var deleteret og Met i position 137 erstattet med Cys, har vist
30 sig at have forøget varmestabilitet og specifik aktivitet.

Den foreliggende opfindelse angår hidtil ukendte derivater af humant IFN- γ -polypeptid, hvori visse aminosyrer
35 fra humant IFN- γ -polypeptid er fjernet, og visse aminosyrer, forskellige fra nævnte aminosyrer, er erstattet

med andre aminosyrer. De hidtil ukendte derivater har høj IFN- γ -aktivitet og forventes at blive nyttige som lægemidler, såsom antivirale og antitumore midler.

5 På tegningen viser:

Fig. 1 et diagram for konstruktionen af plasmid pGVT137. Som steder for HinfI og TaqI er kun angivet de, der anvendes til konstruktionen.

10

Fig. 2 er et diagram for konstruktionen af plasmid pGNC5. Som steder for TaqI er kun angivet de, der anvendes til konstruktionen.

15

Fig. 3 er et diagram for konstruktionen af plasmid pGNB4. Som steder for TaqI er kun angivet de, der anvendes til konstruktionen.

20

Fig. 4 er et diagram for konstruktionen af plasmid pGNA3. Som steder for TaqI er kun angivet de, der anvendes til konstruktionen.

25

Det tilsigtes med den foreliggende opfindelse at tilvejebringe et rekombinant plasmid, hvori inkorporeres en DNA kodende for et hidtil ukendt derivat af humant IFN- γ , en mikroorganisme indeholdende plasmidet, en fremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt derivat af humant IFN- γ -polypeptid under anvendelse af mikroorganismen og derivatet af humant IFN- γ -polypeptid som sådant.

30

Konstruktionen af det rekombinante plasmid udføres ved som udgangsmateriale at anvende cDNA opnået fra messenger-RNA kodende for IFN- γ ved rekombinant DNA teknologi eller kromosomal DNA kodende for IFN- γ .

35

I den foreliggende opfindelse kan en vilkårlig human IFN- γ -cDNA anvendes, og pIFN γ -G4 er særlig foretrukket.

Escherichia coli indeholdende pIFN γ -G4 er blevet depone-
ret i American Type Culture Collection, USA under beteg-
nelsen ATCC 39123.

- 5 DNA-sekvensen i IFN- γ -DNA i pIFN γ -G4 blev bestemt ved
metoden ifølge Maxam og Gilbert [Proc. Natl. Acad. Sci.,
USA, 74, 560 (1977)] og er vist i tabel 1.

10

15

20

25

30

35

TABEL 1

CACATTGTTCTGATCATCTGAAGATCAGCTATTAGAAGAGAAAGATCAGTTAAGTCCTTTGGACCTGATCAGCTTGATACAAGAACTACTGATT
-20
CAACTTCTTTGGCTTAATTCTCTCGGAAACG ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TTT CAG CTC TGC ATC GTT TTG
gly ser leu gly CYS TYR CYS GLN ASP PRO TYR VAL GLN GLU ALA GLU ASN LEU LYS LYS TYR PHE ASN ALA 20
GGT TCT CTT GGC TGT TAC TGC CAG GAC CCA TAT GTA CAA GAA GCA GAA AAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA
1 10
GLY HIS SER ASP VAL ALA ASP ASN GLY THR LEU PHE LEU GLY ILE LEU LYS ASN TRP LYS GLU GLU SER ASP 40
GGT CAT TCA GAT GTA GCG GAT AAT GGA ACT CTT TTC TTA GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA GAG GAG AGT GAC
50 60
ARG LYS ILE MET GLN SER GLN ILE VAL SER PHE TYR PHE LYS LEU PHE LYS ASN PHE LYS ASP ASP GLN SER
AGA AAA ATA ATG CAG AGC CAA ATT GTC TCC TTT TAC TTC AAA CTT TTT AAA AAC TTT AAA GAT GAC CAG AGC
70 80 90
ILE GLN LYS SER VAL GLU THR ILE LYS GLU ASP MET ASN VAL LYS PHE PHE ASN SER ASN LYS LYS LYS ARG
ATC CAA AAG AGT GTG GAG ACC ATC AAG GAA GAC ATG AAT GTC AAG TTT TTC AAT AGC AAC AAA AAG AAA CGA
100 110
ASP ASP PHE GLU LYS LEU THR ASN TYR SER VAL THR ASP LEU ASN VAL GLN ARG LYS ALA ILE HIS GLU LEU
GAT GAC TTC GAA AAG CTG ACT AAT TAT TCG GTA ACT GAC TTG AAT GTC CAA CGC AAA GCA ATA CAT GAA CTC
120 130 140
ILE GLN VAL MET ALA GLU LEU SER PRO ALA ALA LYS THR GLY LYS ARG LYS ARG SER GLN MET LEU PHE ARG
ATC CAA GTG ATG GCT GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA ACA GGG AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CGA
146
GLY ARG ARG ALA SER GLN
GGT CGA AGA GCA TCC CAG TAA TGSTTGCTGCTGCAATATTTGAATTTTAAATCTAAATCTATTTATTAATATTTAACATTATTTA

TATGGGGAATATATTTTTAGACTCATCAATCAAATAAGTATTTATAATAGCAACTTTTGTGTAATGAAATGAATATCTATTAATATATGTATTA

TTTATAATTCCTATATCCTGTGACTGTCTCACTTAATCCTTTGTTTTCTGACTAATTAGGCAAGGCTATGTGATTACAAGGCTTTATCTCAGGGG

CCAACTAGGCAGCCAACCTAAGCAAGATCCCATGGGTTGTGTGTTATTTCACTTGATGATACAATGAACACTTATAAGTGAAGTGATACTATCC

AGTTACTA CCCCCC-.....
↓

Sammenligning mellem den humane IFN- γ -cDNA i pIFN γ -G4 og den kendte IFN- γ -cDNA [R. Devos, et al., Nucleic Acids Research, 10, 2487 (1982)] viser følgende. Den første base af den triplet, der koder for den 9. aminosyre fra den N-terminale ende i det modne humane IFN- γ -polypeptid, lysin, er i den kendte cDNA adenin (A) [R. Davos, et al., Nucleic Acids Research, 10, 2487 (1982)]. På den anden side, da den tilsvarende base i pIFN γ -G4 cDNA er cytosin (C), er den 9. aminosyre fra den N-terminale ende af det humane IFN- γ -polypeptid, indkodet af pIFN γ -G4 cDNA, glutamin og ikke lysin. Det er derfor indlysende, at pIFN γ -G4 koder for et hidtil ukendt humant IFN- γ -polypeptid.

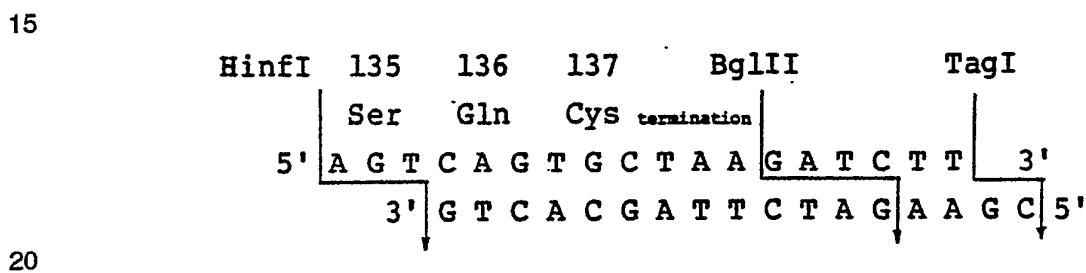
Derivater af IFN- γ opnået ved deletion eller udskiftning af aminosyrer i IFN- γ vist i tabel 1 er også hidtil ukendte IFN- γ -derivater.

Som det plasmid, der skal inkorporere en DNA kodende for IFN- γ -derivat, kan et vilkårligt plasmid anvendes, så længe det deri inkorporerede DNA kan udtrykkes i Escherichia coli. Foretrukket kan anvendes et plasmid, hvori en fremmed DNA kan indsættes nedstrøms for en egnet promoter, såsom tryptophan-promoter (P_{trp}), lac-promoter eller P_L -promoter af λ -fag, og længden mellem Shine-Dalgarno-sekvens (i det følgende benævnt SD-sekvens) og initieringscodon (ATG) indstilles, f.eks. til 6-18 basepar. Foretrukne eksempler er pKYP10, pKYP11 og pKYP12, som blev konstrueret af opfinderne til den foreliggende opfindelse (japansk offentliggjort uundersøgt patentansøgning nr. 110600/83).

Som vist på fig. 1 kløves pGBD1 (referenceeksempel 1) med BamHI og TaqI, og nedbrydningsproduktet renses ved polyacrylamidgelelektroforese [A.M. Maxam, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 560 (1977)] til opnåelse af et DNA-fragment på ca. 310 basepar (i det følgende benævnt bp).

Derpå kløves pGKA2 (referenceeksempel 2) med HindIII og HinfI, og et DNA-fragment på ca. 400 bp indeholdende en stor del af IFN- γ strukturen opnås ved polyacrylamid-gelelektroforese.

5 pKYP10 (japansk offentliggjort uundersøgt patentansøgning nr. 110600/83) kløves med HindIII og BamHI til opnåelse af et DNA-fragment på ca. 4,3 kb indeholdende en tryptophan-promoter. For at opnå et IFN- γ derivat, hvori aminosyren i position 137 af det modne humane IFN- γ -polypeptid, Met, er erstattet med Cys, og aminosyrerne i positionerne 138-146 er deleteret, syntetiseres den i det følgende viste DNA-linker separat.



De rensede DNA-fragmenter og den syntetiske DNA-linker liggeres med T4 DNA-ligase til opnåelse af det rekombinante plasmid pGVT137, der er vist på fig. 1. Plasmidet koder for IFN- γ -derivatet [137-Cys-IFN- γ -(Δ 138-146)], der har Cys som aminosyren i position 137 og ikke har aminosyrerne i positionerne 138-146.

For at konstruere det rekombinante pGNC5, der koder for
derivatet [1-Ser-137-Cys-IFN- γ -(Δ 138-146)], skæres pGVL10
derpå (referenceeksempel 4) med HindIII og TaqI, og et
DNA-fragment på ca. 300 bp opnås. Separat skæres pGVT137
DNA opnået i eksempel 1 med BglIII og TaqI henholdsvis
HindIII og BglIII til opnåelse af DNA-fragmenter på ca.
130 bp og ca. 4,6 kb. DNA-fragmenterne liggeres med T4 DNA
ligase til opnåelse af det rekombinante plasmid pGNC5,
der er vist på fig. 2.

Det rekombinante plasmid pGNB4, der koder for 3-Ser-137-Cys-IFN- γ -(Δ 138-146), og det rekombinante plasmid pGN3, der koder for 1,3 Ser-137-Cys-IFN- γ -(Δ 138-146), konstrueres efter samme metode som beskrevet i det foregående med den undtagelse, at plasmiderne pGVM101 (fig. 3) og pGVK13 (fig. 4) anvendes som kilde for DNA kodende for den N-terminale del af IFN- γ .

De reaktionsbetingelser, der kræves for den rekombinante DNA teknologi som beskrevet i det foregående, er almindeligvis som følger.

Nedbrydning af DNA med restriktionsenzymmer udføres sædvanligvis ved omsætning af 0,1 til 20 μ g DNA med 0,1 til 100 enheder, foretrukket 1 til 3 enheder restriktionsenzym pr. 1 μ g DNA i en blanding af 2 til 200 mM, foretrukket 10 til 40 mM Tris-HCl (pH 6,0-9,5, foretrukket pH 7,0-8,0), 0 til 200 mM NaCl og 2 til 20 mM, foretrukket 5 til 10 mM $MgCl_2$ ved 20 til 70 °C (optimal temperatur afhænger af anvendte restriktionsenzymmer) i 15 minutter til 24 timer. Reaktionen standses sædvanligvis ved opvarmning til 55-75 °C i 5-30 minutter eller også ved inaktivering af restriktionsenzymet med et reagens, såsom phenol eller diethylpyrocarbonat.

Rensning af DNA-fragmenterne dannet ved nedbrydning med restriktionsenzymmer udføres ved agarosegelelektroforese under anvendelse af agarosegel, der gelerer ved lav temperatur [L. Wieslander, Analytical Biochemistry 98, 305 (1979), i det følgende benævnt LGT-metoden] eller polyacrylamidgelelektroforese.

Ligering af DNA-fragmenterne udføres med 0,3-10 enheder T4 DNA-ligase i en blanding af 2-200 mM, foretrukket 10-40 mM, Tris-HCl (pH 6,1-9,5, foretrukket 7,0-8,0), 2-20 mM, foretrukket 5-10 mM $MgCl_2$, 0,1-10 mM, foretrukket 0,5-2,0 mM ATP og 1-50 mM, foretrukket 5-10 mM dithio-

threitol ved 1-37 °C, foretrukket 3-20 °C i 15 minutter til 72 timer, foretrukket 2-20 timer. Den rekombinante plasmid-DNA dannet ved ligeringsreaktionen indføres i Escherichia coli ved transformationsmetoden ifølge Cohen et al. [S.N. Cohen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)], om nødvendigt. Isolation af den rekombinante plasmid-DNA fra Escherichia coli indeholdende DNA'en udføres ved den metode, der er beskrevet i eksempel 1, eller metoden ifølge Birnboim, et al. [H.C. Birnboim, et al., Nucleic Acids Research, 7, 1513 (1979)]. Plasmid-DNA nedbrydes med 1-10 typer restriktionsendonukleaser, og kløvningsstederne undersøges ved agarosegelelektroforese eller polyacrylamidgelelektroforese. Om nødvendigt undersøges DNA-sekvensen af DNA'en yderligere ved Maxam-Gilbert sekventeringsmetoden [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 560 (1977)].

De rekombinante plasmider kan fremstilles under de i det foregående beskrevne betingelser.

Derivatet af IFN- γ -polypeptid ifølge opfindelsen fremstilles ved følgende metode.

Escherichia coli K-12 HB101 transformeres med et plasmid, såsom pGVA4, og en Escherichia coli-stamme indeholdende pGVA4 udvælges fra de ampicillinresistente (i det følgende benævnt Ap^R) kolonier. Escherichia coli-stamme indeholdende pGVA4 dyrkes i et medium til fremstilling af et derivat af IFN- γ -polypeptid i mediet.

Som medium kan der enten anvendes et syntetisk medium eller et naturligt medium, så længe det er egnet til dyrkning af Escherichia coli og produktionen af IFN- γ -polypeptidderivatet.

Som carbonkilde kan der f.eks. anvendes glucose, fructose, lactose, glycerol, mannitol og sorbitol.

Som nitrogenkilde der kan der f.eks. anvendes NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, casaminosyre, gærekstrakt, polypepton, kød-ekstrakt, "Bactotrypton" og majsstøbevæske.

- 5 Desuden kan der anvendes næringsstoffer, såsom K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , MgSO_4 , vitamin B_1 og MgCl_2 .

Dyrkningen udføres ved pH 5,5 til 8,5 og ved 18 til 40 °C med luftning og omrøring.

10

Efter dyrkning i 5-90 timer akkumuleres derivatet af humant IFN- γ -polypeptid i dyrkede celler. De indsamlede celler behandles med lysozym, sønderdeles ved gentagen frysning og optøning og underkastes centrifugering. Den således opnåede ovenliggende væske underkastes ekstraktion efter en konventionel metode til ekstraktion af polypeptider til udvinding af polypeptidet.

15

- Bestemmelse af den humane IFN- γ -aktivitet udføres efter metoden ifølge Armstrong [J.A. Armstrong, et al., Appl. Microbiol. 21, 723-725 (1971)].

20

- Visse specifikke udførelsesformer for den foreliggende opfindelse forklares nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

25

EKSEMPEL 1

Konstruktion af rekombinant plasmid pGVT137 kodende for 137-Cys-IFN- γ -(Δ 138-146)

30

- 10 μg pGBD1-DNA opnået i referenceeksempel 3 blev opløst i 50 μl (totalvolumen) af en opløsning bestående af 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl_2 , 10 mM dithiothreitol og 100 mM NaCl (i det følgende benævnt "Y-100 bufferopløsning"). Derpå tilsættes 20 enheder restriktionsenzym BamHI (produkt fra Takara Shuzo Co., ligesom alle i det

35

HinfI 135 136 137 BglIII TaqI
 Ser Gln Cys termination
 35 5' A G T C A G T G C T A A G A T C T T 3' 18-mer
 3' G T C A C G A T T C T A G A A G C 5' 17-mer

To enkeltkædede DNA'er, en 18-mer og en 17-mer, blev syntetiseret ved en konventionel triestermetode [R. Crea, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 5765 (1978)]. Derpå blev 2 µg af såvel den 18-mer som den 17-mer DNA opløst i 50 µl (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA og 1 mM ATP. 30 enheder T4 polynukleotidkinase (produkt fra Takara Shuzu Co.) blev tilsat, og phosphoryleringsreaktion blev udført ved 37 °C i 60 minutter.

Derpå blev 0,5 µg af TaqI-BamHI-fragmentet på ca. 310 bp afledt fra pGBD1, 0,5 µg af HindIII-HinfI-fragmentet på ca. 400 bp afledt fra pGKA2 og 1,0 µg af HindIII-BamHI-fragmentet på ca. 4,3 kb af udtrykkelsesvektoren pKYP10, som opnået i det foregående, opløst i 25 µl T4 ligase-pufferopløsning. Ca. 0,1 µg af den i det foregående nævnte DNA-linker blev sat til blandingen efterfulgt af tilsætning af 6 enheder T4 DNA-ligase. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer.

Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den resulterende rekombinante plasmidblanding til opnåelse af en AP^R koloni.

Plasmid pGVT137 vist på fig. 1 blev isoleret fra dyrkningsbouillon for kolonien. Strukturen af pGVT137 blev bekræftet ved nedbrydning med EcoRI, ClaI, BglII og BamHI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved metoden ifølge [A.M. Maxam et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 560 (1977)], at DNA-sekvensen omkring HinfI-TaqI i plasmidet pGVT137 var som følger:

HinfI	135	136	137	BglII	TaqI
	Ser	Gln	Cys	termination	
	A G T C A G T G C T A A	G A T C T T			
	G T C A C G A T T C T A G	A A G C			

Det humane IFN- γ -polypeptidderivat, som pGVT137 koder for [derivatet kaldes 137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)], er klart forskelligt fra det kendte humane IFN- γ -polypeptid derved, at den 137. aminosyre (Met) i det modne humane IFN- γ er erstattet med Cys, og de 9 aminosyrer fra den C-terminale ende, aminosyre 138 (Leu) til 146 (Gln) er deleteret.

Escherichia coli stamme indeholdende plasmid pGVT137 er blevet deponeret hos Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology (i det følgende benævnt FRI) som Escherichia coli IGVT137 (FERM BP-547).

EKSEMPEL 2

Konstruktion af rekombinant plasmid pGNC5 kodende for 1-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146):

10 μ g pGVL10 DNA opnået i referenceeksempel 4 blev opløst i 50 μ l Y-100 pufferopløsning. 20 enheder restriktionsenzym HindIII blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev foretaget ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev der tilsat 20 enheder restriktionsenzym TaqI, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 65 °C i 2 timer. Der blev opnået ca. 0,5 μ g af et DNA-fragment på ca. 300 bp indeholdende det 5'-terminale område af IFN- γ strukturgenet ud fra reaktionsopløsningen ved polyacrylamidgelelektroforese.

Separat blev 10 μ g pGVT137 opnået i eksempel 1 opløst i 50 μ l Y-100 pufferopløsning, og 20 enheder restriktionsenzym BglII blev tilsat. Nedbrydningsreaktionen blev udført ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev 20 enheder restriktionsenzym TaqI tilsat, og nedbrydningsreaktionen blev udført ved 65 °C i 2 timer. Der blev opnået ca. 0,4 μ g af et DNA-fragment på ca. 130 bp indeholdende det 3'-terminale område af IFN- γ strukturgenet fra reaktionsopløsningen ved polyacrylamidgelelektroforese.

Separat blev 5 µg plasmid pGVT137 DNA opløst i 50 µl Y-100 pufferopløsning, og 10 enheder af hvert af restriktionsenzymene HindIII og BglII blev tilsat. Nedbrydningsreaktionen blev foretaget ved 37 °C i 3 timer.

5

Ca. 2,0 µg af et DNA-fragment på ca. 4,6 kb indeholdende det 3'-non-translationale område og P_{trp} blev opnået fra reaktionsopløsningen ved LGT-metoden.

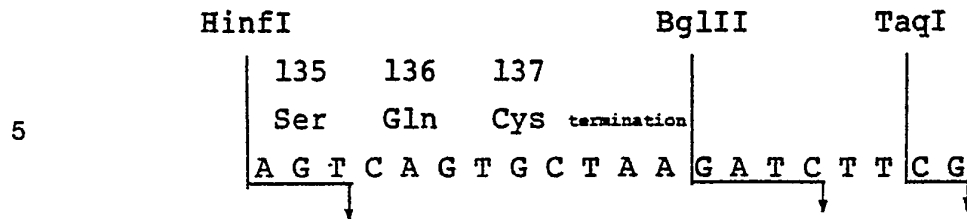
Derpå blev 0,4 µg af HindIII-TaqI fragmentet (ca. 300 bp) afledt fra pGVL10, 0,5 µg af BglII-TaqI fragmentet (ca. 130 bp) afledt fra pGVT137 og 1,0 µg af HindIII-BglII fragmentet (ca. 4,6 kb) afledt fra det samme plasmid, som var opnået i det foregående, opløst i 25 µl T4 ligase-pufferopløsning. 6 enheder T4 DNA-ligase blev tilsat, og ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer.

Escherichia coli stamme HB101 blev transformeret med den resulterende rekombinante plasmidblanding til opnåelse af en Ap^R koloni.

Plasmid pGNC5, der er vist på fig. 2, blev isoleret fra dyrkningsbouillon for kolonien. Strukturen af pGNC5 blev bekræftet ved nedbrydning med HindIII, EcoRI, BglII, 25 ClaI og BamHI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved Maxam-Gilbert-metoden, at DNA-sekvensen omkring HindIII-SinI var som følger:

30 HindIII Met Ser Tyr Cys Gln SinI Asp
 A G C T T A T G T C T T A C T G C C A G G A C

35 og at DNA-sekvensen omkring HinfI-TaqI var som følger:



Det humane IFN- γ -polypeptidderivat, som pGNC5 koder for [derivatet kaldes 1-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)], er klart forskelligt fra det kendte humane IFN- γ -polypeptid derved, at den 1. aminosyre (Cys) i det modne humane IFN- γ er erstattet med Ser, aminosyre 137 (Met) er erstattet med Cys, og de 9 aminosyrer fra den C-terminale ende, aminosyre 138 (Leu) til aminosyre 146 (Gln), er deletet. Escherichia coli stamme indeholdende plasmid pGNC5 er blevet deponeret hos FRI som Escherichia coli IGNC5 (FERM BP-550)

20 EKSEMPEL 3

Konstruktion af rekombinant plasmid pGNB4 kodende for 3-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146):

10 μ g pGVM101 DNA opnået i referenceeksempel 5 blev opløst i 50 μ l Y-100 pufferopløsning. 20 enheder restriktionsenzym HindIII blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev foretaget ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev der tilsat 20 enheder restriktionsenzym TaqI, og nedbrydningsreaktionen blev udført ved 65 °C i 2 timer. Der blev opnået ca. 0,5 μ g af et DNA-fragment på ca. 300 bp indeholdende det 5'-terminale område af IFN- γ -strukturgenet fra reaktionsopløsningen ved polyacrylamidgelelektroforese.

35 Separat blev 10 μ g pGVT137 opnået i eksempel 1 opløst i 50 μ l Y-100 pufferopløsning, og 20 enheder restriktionsenzym BglII blev tilsat. Nedbrydningsreaktionen blev ud-

ført ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev 20 enheder restriktionsenzym TaqI tilsat, og nedbrydningsreaktionen blev udført ved 65 °C i 2 timer. Der blev opnået ca. 0,4 µg af et DNA-fragment på ca. 130 bp indeholdende det 3'-terminale område af IFN- γ -strukturgenet fra reaktionsopløsningen ved polyacrylamidgelelektroforese.

Separat blev 5 µg plasmid pGVT137 DNA opløst i 50 µl Y-100 pufferopløsning, 10 enheder af hvert af restriktionsenzymene HindIII og BglII blev tilsat. Nedbrydningsreaktionen blev foretaget ved 37 °C i 3 timer.

Ca. 2,0 µg af et DNA-fragment på ca. 4,6 kb indeholdende det 3'-non-translational område og P_{trp} blev opnået fra reaktionsopløsningen ved LGT-metoden.

Derpå blev 0,4 µg af HindIII-TaqI fragmentet (ca. 300 bp) afledt fra pGVM101, 0,5 µg af BglII-TaqI fragmentet (ca. 130 bp) afledt fra pGVT137 og 1,0 µg af HindIII-BglII fragmentet (ca. 4,6 kb) afledt fra det samme plasmid, som blev opnået i det foregående, opløst i 25 µl T4 ligase-pufferopløsning. 6 enheder T4 DNA-ligase blev tilsat, og liggeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer.

Escherichia coli stamme HB101 blev transformeret med den resulterende rekombinante plasmidblanding til opnåelse af en Ap^R koloni.

Plasmid pGNB4, vist i fig. 3, blev isoleret fra dyrkningsbouillon for kolonien. Strukturen af pGNB4 blev bekræftet ved nedbrydning med HindIII, EcoRI, BglII, ClaI og BamHI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved Maxam-Gilbert-metoden, at DNA-sekvensen omkring HindIII-SinI i pGNB4 var som følger:

striktionsenzym TaqI tilsat, og nedbrydningsreaktionen blev udført ved 65 °C i 2 timer. Der blev opnået ca. 0,5 µg af et DNA-fragment på ca. 300 bp indeholdende det 5'-terminale område af IFN- γ -strukturgenet fra reaktionsopløsningen ved polyacrylamidgelelektroforese.

Separat blev 10 µg pGVT137 opnået i eksempel 1 opløst i 50 µl Y-100 pufferopløsning, og 20 enheder restriktionsenzym BglII blev tilsat. Nedbrydningsreaktionen blev udført ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev 20 enheder restriktionsenzym TaqI tilsat, og nedbrydningsreaktionen blev udført ved 65 °C i 2 timer. Der blev opnået ca. 0,4 µg af et DNA-fragment på ca. 130 bp indeholdende det 3'-terminale område af IFN- γ -strukturgenet fra reaktionsopløsningen ved polyacrylamidgelelektroforese.

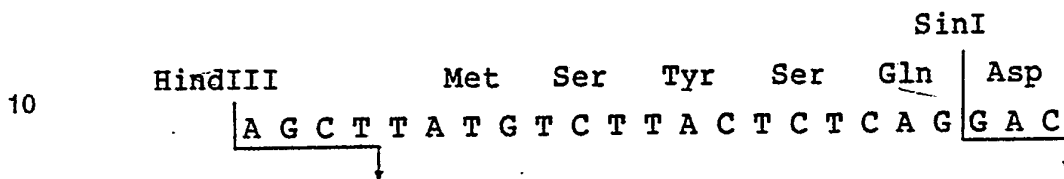
Separat blev 5 µg plasmid pGVT137 DNA opløst i 50 µl Y-100 pufferopløsning, 10 enheder af hvert af restriktionsenzymerne HindIII og BglII blev tilsat. Nedbrydningsreaktionen blev foretaget ved 37 °C i 3 timer.

Ca. 2,0 µg af et DNA-fragment på ca. 4,6 kb indeholdende det 3'-non-translationale område og P_{trp} blev opnået fra reaktionsopløsningen ved LGT-metoden.

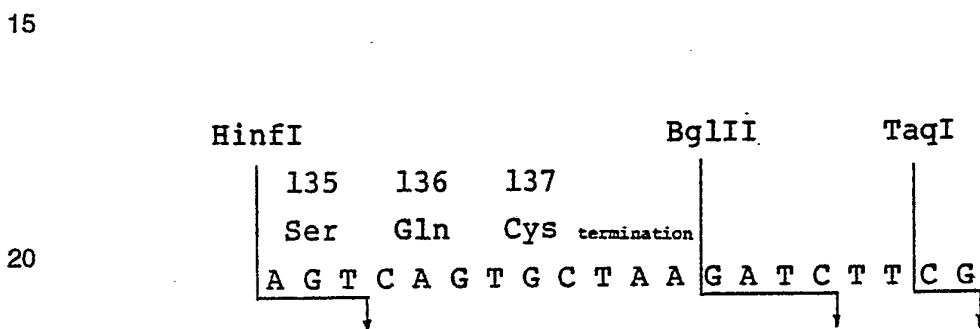
Derpå blev 0,4 µg af HindIII-TaqI fragmentet (ca. 300 bp) afledt fra pGVK13, 0,5 µg af BglII-TaqI fragmentet (ca. 130 bp) afledt fra pGVT137 og 1,0 µg af HindIII-BglII fragmentet (ca. 4,6 kb) afledt fra det samme plasmid, som blev opnået i det foregående, opløst i 25 µl T4 ligasepufferopløsning. 6 enheder T4 DNA-ligase blev tilsat, og ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer.

Escherichia coli stamme HB101 blev transformeret med den resulterende rekombinante plasmidblanding til opnåelse af en Ap^R koloni.

Plasmid pGNA3, vist i fig. 4, blev isoleret fra dyrkningsbouillon for kolonien. Strukturen af pGNA3 blev bekræftet ved nedbrydning med HindIII, EcoRI, BglII, ClaI og BamHI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved Maxam-Gilbert-metoden, at DNA-sekvensen omkring HindIII-SinI i pGNA3 var som følger:



og at DNA-sekvensen omkring HinfI-TaqI var som følger:



Det humane IFN- γ -polypeptidderivat, som pGNA3 koder for [derivatet kaldes 1,3-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)], er klart forskelligt fra det kendte humane IFN- γ -polypeptid derved, at den 1. og den 3. aminosyre (Cys) i det modne humane IFN- γ er erstattet med Ser, aminosyre 137 (Met) er erstattet med Cys, og de 9 aminosyrer fra den C-terminale ende, aminosyre 138 (Leu) til aminosyre 146 (Gln), er deleteret. Escherichia coli stamme indeholdende plasmid pGNA3 er blevet deponeret hos FRI som Escherichia coli IGNA3 (FERM BP-548).

35 EKSEMPEL 5

Produktion af IFN- γ derivater med Escherichia coli stam-

mer indeholdende pGVT137, pGNC5, pGNB4 og pGNA3

Escherichia coli HB101-stammer indeholdende rekombinante plasmider pGVT137, pGNC5, pGNB4 og pGNA3 opnået i eksempel 1-4, som kaldes henholdsvis IGVT137, IGNC5, IGNB4 og IGNA3, blev dyrket ved 37 °C i 18 timer i LG-medium (10 g trypton, 5 g gærekstrakt, 5 g NaCl, 2 g glucose, 1 liter vand, indstillet til pH 7,0 med NaOH). 0,2 ml af dyrkningsbouillon blev inokuleret i 10 ml MCG-medium (0,6% Na₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,5% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 0,5% glucose, 0,5% casaminosyre, 1 mM MgSO₄, 4 µg/ml vitamin B₁, pH 7,2) og dyrkning blev udført ved 30 °C i 4-8 timer. Derpå blev 10 µg/ml indolylacrylsyre (i det følgende benævnt IAA), som er en inducer for tryptophan, tilsat, og dyrkning blev fortsat i 2-12 timer. Dyrkningsbouillon blev centrifugeret ved 8000 omdr./min. i 10 minutter, og de høstede celler blev vasket med en pufferopløsning indeholdende 30 mM NaCl og 30 mM Tris-HCl (pH 7,5). Vaskede celler blev suspenderet i 1 ml af pufferopløsningen som beskrevet i det foregående, og 5 µl af en opløsning indeholdende 200 µg lysozym og 0,25 M EDTA (ethylendiamintetraeddikesyre) blev tilsat. Blandingen fik lov at henstå ved 0 °C i 30 minutter, og frysning og optøning blev gentaget 3 gange for at sønderdele cellerne. De sønderdelte celler blev centrifugeret ved 15000 omdr./min. i 30 minutter til opnåelse af en overliggende væske. Mængden af interferon i den overliggende væske blev bestemt efter metoden ifølge Armstrong [J.A. Armstrong, et al., Appl. Microbiol., 21, 723-725 (1971)], hvori Sindvis-virus blev anvendt som virus, og FL-celler afledt fra humane amnionceller blev anvendt som dyrecellerne. Resultaterne er vist i tabel 2.

TABEL 2

	Stamme	Plasmid	Produkt, som plasmidet koder for	IFN- γ (enheder/ ml)
5	IGVT137	pGVT137	137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)	8×10^4
	IGNA3	pGNA3	1,3-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)	8×10^5
10	IGNB4	pGNB4	3-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)	1×10^6
	IGNC5	pGNC5	1-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)	5×10^5
	IGKA2	pGKA2	IFN- γ	2×10^4

IGKA2 er en stamme indeholdende plasmid pGKA2, der koder for IFN- γ .

20 EKSEMPEL 6

Eksperiment vedrørende varmemestabilitet af IFN- γ -derivater; 137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146), 1-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146), 3-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146) og 1,3-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)

Escherichia coli HB101-stammer indeholdende rekombinante plasmider pGVT137, pGNC5, pGNB4 og pGNA3 opnået i eksempel 1-4, som kaldes henholdsvis IGVT137, IGNC5, IGNB4 og IGNA3, blev dyrket ved 37 °C i 18 timer i LG-medium. 0,2 ml af dyrkningsbouillon blev inokuleret i 10 ml MCG-medium, og der blev foretaget dyrkning ved 30 °C i 4-8 timer. Derpå blev 10 μ g/ml IAA tilsat, og dyrkningen blev fortsat i 2-12 timer. Dyrkningsbouillon blev centrifugeret ved 8000 omdr./min. i 10 minutter, og de høstede celler blev vasket med 30 mM Tris-HCl (pH 7,5) pufferopløsning indeholdende 30 mM NaCl. Vaskede celler blev

suspenderet i 1 ml pufferopløsning som beskrevet i det foregående, og 5 μ l af en opløsning indeholdende 200 μ g lysozym og 0,25 M EDTA blev tilsat. Blandingen fik lov at henstå ved 0 °C i 30 minutter, og frysning og optøning blev gentaget 3 gange for at sønderdele cellerne. De sønderdelte celler blev centrifugeret ved 15000 omdr./min. i 30 minutter til opnåelse af en overliggende væske. Den overliggende væske blev opvarmet ved 50 °C i 1 time, og den antivirale aktivitet af interferon blev bestemt efter metoden ifølge Armstrong til måling af restaktiviteten (%).

Resultaterne er vist i tabel 3.

15

TABEL 3

Stamme	Plasmid	Produkt som plasmidet koder for	Restaktivitet efter varmebehandling ved 50°C i 1 time (%)
IGVT137	pGVT137	137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)	81
IGNC5	pGNC5	1-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)	86
IGNB4	pGNB4	3-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)	98
IGNA3	pGNA3	1,3-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146)	23
IGKA2	pGKA2	IFN- γ	25

30

Referenceeksempel 1

Indsætning af human IFN- γ -DNA i udtrykkelsesvektoren pKYP11

35

I dette eksempel blev 6 μ g plasmid pIFN γ -G4 (3,6 kb) opløst i 50 μ l (totalvolumen) af en opløsning inde-

- holdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 10 mM dithiothreitol og 50 mM NaCl. Derpå blev 12 enheder af hvert af restriktionsenzymene PvuII og HindIII tilsat, og nedbrydningsreaktionen blev udført ved 37 °C i 2 timer. Reaktionsopløsningen blev opvarmet ved 65 °C i 7 minutter for at inaktivere enzymerne og underkastet rensning ved LGT-metoden til opnåelse af 1,2 µg af et DNA-fragment på 1,3 kb indeholdende human IFN- γ -DNA.
- Separat blev 4 µg pKYP11 opløst i 40 µl (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 20 mM dithiothreitol og 50 mM NaCl. 8 enheder BamHI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Reaktionsopløsningen blev opvarmet ved 65 °C i 5 minutter for at inaktivere enzymet. Derefter blev 30 µM af hvert af stofferne dATP, dCTP, dGTP og dTTP tilsat, og 8 enheder Escherichia coli DNA polymerase I (Klenow fragment, produkt fra New England Biolabs, 1 µl) blev tilsat. Udfyldningsreaktion blev udført ved 15 °C i 1 time, og reaktionsopløsningen blev opvarmet ved 68 °C i 15 minutter for at inaktivere DNA polymerase I. 10 enheder HindIII blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer efterfulgt af opvarmning ved 65 °C i 5 minutter for at inaktivere HindIII. Nedbrydningsreaktionsopløsningen af plasmid pKYP11 blev underkastet rensning ved LGT-metoden til opnåelse af 2,5 µg af et DNA-fragment på ca. 4,7 kb indeholdende P_{trp} .
- Derpå blev 0,5 µg af DNA-fragmentet på 1,3 kb indeholdende human IFN- γ -DNA og 1,0 µg af DNA-fragmentet på ca. 4,7 kb indeholdende P_{trp} , som var opnået fra plasmid pKYP11, opløst i 20 µl af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM $MgCl_2$, 5 mM dithiothreitol og 500 µM ATP, og 4 enheder T4 DNA-ligase blev tilsat. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 18 timer, og Escherichia coli HB101 blev transformeret med den resulterende rekomb-

binante plasmidblanding ved konventionel teknik til opnåelse af en Ap^R koloni. Plasmid pGC7 blev skilt fra dyrkningsbouillon for kolonien. Strukturen af pGC7 blev bekræftet ved nedbrydning med HindIII, HpaI, SallI, EcoRI og ClaI og agarosegelelektroforese. Escherichia coli stamme indeholdende pGC7 er blevet deponeret hos FRI som Escherichia coli IGC7 (FERM BP-497).

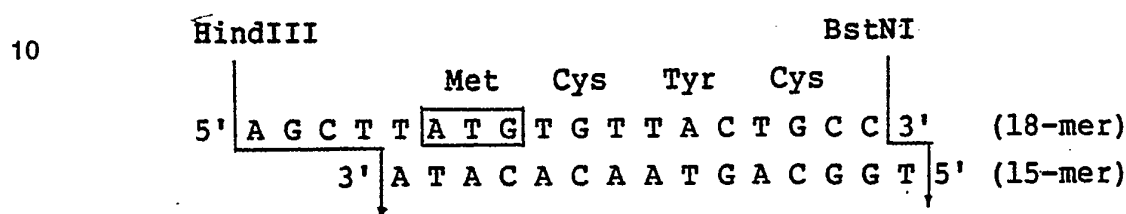
Referenceeksempel 2

Konstruktion af rekombinant plasmid pGKA2

I dette eksempel blev 6 µg af den pGC7 DNA, der blev opnået i referenceeksempel 1, opløst i 50 µl (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 10 mM NaCl, og 12 enheder BstNI (produkt fra New England Biolabs) blev tilsat. Der blev udført reaktion ved 60 °C i 3 timer, og reaktionsopløsningen blev opvarmet ved 65 °C i 5 minutter for at inaktivere BstNI. Derpå blev NaCl tilsat til en endelig koncentration på 150 mM, og 8 enheder SallI blev tilsat. Nedbrydningsreaktionen blev udført ved 37 °C i 3 timer. Reaktionsopløsningen blev igen opvarmet ved 65 °C i 5 minutter for at inaktivere SallI og underkastet rensning ved LGT-metoden til opnåelse af ca. 0,8 µg af et DNA-fragment på ca. 1125 bp indeholdende en stor del af den humane IFN-γ-DNA.

Separat blev 3 µg pKYP10 opløst i 40 µl (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 100 mM NaCl. 6 enheder af hvert af HindIII og SallI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Reaktionsopløsningen blev opvarmet ved 65 °C i 5 minutter for at inaktivere HindIII og SallI og underkastet rensning ved LGT-metoden til opnåelse af ca. 1,8 µg af et DNA-fragment på ca. 4,1 kb indeholdende P_{trp}.

Den N-terminale aminosyre i det modne humane IFN- γ -polypeptid er Cys. For at udtrykke moden IFN- γ -DNA er det nødvendigt at tilvejebringe en initieringscodon (ATG) lige før den 5'-terminale codon TGT (Cys) og endvidere at indstille længden mellem SD-sekvens nedstrøms fra P_{trp} og ATG til en passende længde på 6-18 bp. Derfor blev følgende DNA-linker syntetiseret:



15 To enkeltkædede DNA'er, en 18-mer og en 15-mer, blev syntetiseret ved en konventionel triestermetode. Derpå blev 2 μ g af såvel den 18-mere som den 15-mere DNA opløst i 20 μ l (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA og 1 mM ATP. 30 enheder T4 polynukleotidkinase (produkt fra Boehringer Mannheim GmbH) blev tilsat, og phosphoryleringsreaktion blev udført ved 37 °C i 60 minutter.

25 Derpå blev 2 μ g af den phosphorylerede 18-mere DNA og den phosphorylerede 15-mere DNA blandet, og blandingen blev opvarmet ved 70 °C i 5 minutter og fik lov at henstå ved stuetemperatur til annelering til opnåelse af DNA-linkeren med den i det foregående angivne struktur.

35 0,4 μ g af BstNI-SalI-fragmentet på 1125 bp opnået i det foregående og afledt fra pGC7 og 1,0 μ g af DNA-fragmentet på 4,1 kb opnået ved nedbrydning af udtrykkelsesvektoren pKYP10 med HindIII og SalI blev opløst i 25 μ l (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol og 500 μ M ATP. Ca.

- 0,1 µg af den ovennævnte DNA-linker blev sat til blandingen efterfulgt af tilsætning af 6 enheder T4 DNA-ligase. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer. Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den resulterende rekombinante plasmidblanding ved konventionel teknik til opnåelse af en Ap^R koloni. Plasmid pGKA2 som vist i fig. 1 blev isoleret fra dyrkningsbouillon for kolonien. Strukturen af pGKA2 blev bekræftet ved nedbrydning med EcoRI, ClaI, HindIII, BstNI og SalI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved Maxam-Gilbert-metoden, at DNA-sekvensen fra SD-sekvensen (AAGG) til initieringscodonen (ATG) i plasmidet pGKA2 var "AAGGGTATCGATAAGCTTATG".
- Escherichia coli stamme indeholdende pGKA2 er blevet deponeret hos FRI som Escherichia coli IGKA2 (FERM BP-496).

Referenceeksempel 3

- Konstruktion af plasmid pGBD1 med BamHI-skæringssted nedstrøms fra IFN-γ-genet

- I dette eksempel blev 2 µg plasmid pIFN_γ-G4 (3,6 kb) opløst i 50 µl (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 50 mM NaCl (i det følgende benævnt "Y-50 pufferopløsning"). Derefter blev 4 enheder af restriktionsenzymet PvuII tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 2 timer. Nedbrydningsproduktet blev underkastet rensning ved LGT-metoden til opnåelse af 1 µg af et DNA-fragment (3,6 kb) af pIFN_γ-G4. 0,1 µg af DNA-fragmentet og 5 pmol 5'-phosphoryleret BamHI-linker (5'-pCCGGATCCGG-3', produkt fra Collaborative Research, Inc.) blev ligeret ved 4 °C i 18 timer med 2 enheder T4-ligase i 20 µl T4-ligasepufferopløsning.

Escherichia coli HB101 [Boliver, et al., Gene 2, 75 (1977)] blev transformeret under anvendelse af det således opnåede rekombinante plasmid-DNA ved metoden ifølge Cohen et al. [S.N. Cohen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)] til opnåelse af en Ap^R koloni. Plasmid-DNA blev isoleret fra transformanten ved den kendte metode [H.C. Birnboim, et al., Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979)]. DNA blev nedbrudt med restriktionsendonukleaser, såsom BamHI, dens struktur blev analyseret for at konstatere, at man havde opnået rekombinant plasmid pGBD1, hvori BamHI-linker var indsat i PvuII-stedet i pIFN γ -G4. Escherichia coli stamme indeholdende pGBD1 er blevet deponeret hos FRI som Escherichia coli IGBD1 (FERM BP-394).

15

Referenceeksempel 4

Konstruktion af rekombinant plasmid pGVL10 kodende for 1-Ser-IFN- γ

20

I dette eksempel blev 6 μ g pGBD1, opnået i referenceeksempel 3, opløst i 50 μ l Y-50 pufferopløsning. 10 enheder SinI blev tilsat, og nedbrydningsreaktionen blev udført ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev der tilsat NaCl til en slutkoncentration på 100 mM, og 10 enheder BamHI blev tilsat. Nedbrydningsreaktionen blev udført ved 37 °C i 3 timer. 0,8 μ g af et DNA-fragment på ca. 850 bp indeholdende en stor del af den humane IFN- γ -DNA blev opnået fra reaktionsopløsningen ved LGT-metoden.

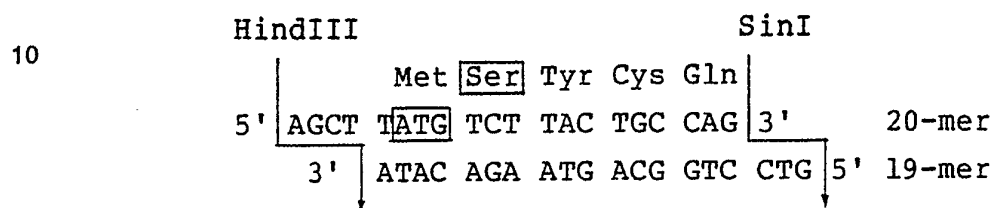
30

Separat blev 3 μ g pKYP10 DNA, fremstillet ved metoden som beskrevet i japansk offentliggjort uundersøgt patentansøgning nr. 110600/83, opløst i 40 μ l (totalvolumen) Y-50 pufferopløsning, og 5 enheder af hvert af HindIII og BamHI blev tilsat. Nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Fra reaktionsopløsningen blev der opnået ca. 1,8 μ g af et DNA-fragment på ca. 4,3 kb indeholdende

35

tryptophan-promoter (P_{trp}) ved LGT-metoden.

Modent humant IFN- γ -polypeptid har den N-terminale struktur Cys-Tyr-Cys-. For at ændre den første Cys til Ser og for at tilvejebringe en initieringscodon ATG, der er nødvendig til udtrykkelse, lige før første Ser, blev følgende DNA-linker syntetiseret:



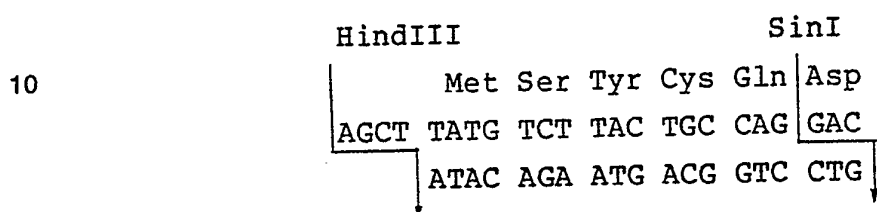
15 To enkeltkædede DNA'er, en 20-mer og en 19-mer, blev syntetiseret ved en konventionel triestermetode. Derpå blev 2 μ g af såvel den 20-mer som den 19-mer DNA opløst i 40 μ l (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA og 1 mM ATP. 30 enheder T4 polynukleotidkinase blev tilsat, og phosphoryleringsreaktion blev udført ved 37 °C i 60 minutter.

25 0,5 μ g af SinI-BamHI-fragmentet på ca. 850 bp afledt fra pGBD1 og 1,0 μ g af HindIII-BamHI-fragmentet på ca. 4,3 kb fra udtrykkelsesvektoren pKYP10, som blev opnået i det foregående, blev opløst i 25 μ l T4 ligasepufferopløsning. Ca. 0,1 μ g af DNA-linkeren nævnt i det foregående blev sat til blandingen efterfulgt af tilsætning af 6 enheder T4 DNA-ligase. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 30 17 timer.

35 *Escherichia coli* HB101 blev transformeret under anvendelse af den resulterende rekombinante plasmidblanding til opnåelse af en Ap^R koloni. Et plasmid, pGVL10 som

vist på fig. 2, blev isoleret fra dyrkningsbouillon for kolonien. Strukturen af pGVL10 blev bekræftet ved nedbrydning med EcoRI, ClaI, HindIII og BamHI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved Maxam-Gilbert-

5 metoden, at DNA-sekvensen fra HindIII-stedet til SinI-stedet i plasmidet pGVL10 var som følger:



15 Det humane IFN- γ -polypeptid, som pGVL10 koder for (derivatet kaldes 1-Ser-IFN- γ), er klart forskelligt fra det kendte humane IFN- γ -polypeptid derved, at den første Cys i det modne humane IFN- γ er erstattet med Ser.

20 Escherichia coli stamme indeholdende plasmid pGVL10 er blevet deponeret hos FRI som Escherichia coli IGVL10 (FERM BP-544).

Referenceeksempel 5

Konstruktion af rekombinant plasmid pGVM101 kodende for 3-Ser-IFN- γ

6 μ g pGBD1-DNA opnået i referenceeksempel 3 blev opløst i

30 50 μ l Y-50 pufferopløsning. 10 enheder SinI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev NaCl tilsat til en slutkoncentration på 100 mM, og 10 enheder BamHI blev tilsat. Nedbrydningsreaktionen blev udført ved 37 °C i 3 timer. 0,8 μ g af et

35 DNA-fragment på ca. 850 bp indeholdende en stor del af den humane IFN- γ -DNA blev opnået fra reaktionsopløsningen ved LGT-metoden.

10 Modent humant IFN- γ -polypeptid har den N-terminale struktur Cys-Tyr-Cys-. For at ændre den 3. aminosyre (Cys) til Ser og inkorporere en initieringscodon (ATG), der er nødvendig for udtrykkelse, lige før den første Cys, blev følgende DNA-linker syntetiseret:

HindIII

SinI

Met Cys Tyr Ser Gln

5' AGCT TATG TGC TAC TCT CAG 3' 20-mer

3' ATAC ACG ATG AGA GTC CTG 5' 19-mer

0,5 µg af SinI-BamHI-fragmentet på ca. 850 bp afledt fra pGBD1 og 1,0 µg af HindIII-BamHI-fragmentet på ca. 4,3 kb af udtrykkelsesvektoren pKYP10, som blev opnået i det foregående, blev opløst i 25 µl T4 ligasepufferopløsning. Ca. 0,1 µg af ovennævnte DNA-linker blev sat til blan-

dingen efterfulgt af tilsætning af 6 enheder T4 DNA-ligase. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer.

5 Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den resulterende rekombinante plasmidblanding til opnåelse af en Ap^R koloni. Et plasmid pGVM101, som vist i fig. 3, blev isoleret fra dyrkningsbouillon for kolonien. Strukturen af pGVM101 blev bekræftet ved nedbrydning med EcoRI, ClaI, HindIII og BamHI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved Maxam-Gilbertmetoden, at DNA-sekvensen fra HindIII-stedet til SinI-stedet i plasmid pGVM101 var som følger:

15

	HindIII						SinI
		Met	Cys	Tyr	Ser	Gln	Asp
	AGCT	TATG	TGC	TAC	TCT	CAG	GAC
		ATAC	ACG	ATG	AGA	GTC	CTG

20

Det humane IFN- γ -polypeptid, som pGVM101 koder for (derivatet kaldes 3-Ser-IFN- γ), er klart forskelligt fra det kendte humane IFN- γ -polypeptid derved, at den 3. aminosyre (Cys) af det modne humane IFN- γ er erstattet med Ser. Escherichia coli stamme indeholdende plasmid pGVM101 er blevet deponeret hos FRI som Escherichia coli IGVM101 (FERM BP-545).

30 Referenceeksempel 6

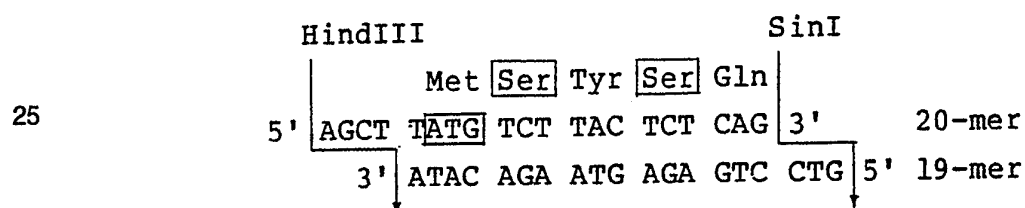
Konstruktion af rekombinant plasmid pGVK13 kodende for 1,3-Ser-IFN- γ

35 6 μ g pGBD1-DNA opnået i referenceeksempel 3 blev opløst i 50 μ l Y-50 pufferopløsning. 10 enheder SinI (produkt fra Bio Tec Co.) blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev

udført ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev NaCl tilsat til en endelig koncentration på 100 mM, og 10 enheder BamHI blev tilsat. Nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Ca. 0,8 µg af et DNA-fragment på ca. 850 bp indeholdende en stor del af den humane IFN- γ -DNA blev opnået fra reaktionsopløsningen ved LGT-metoden.

Separat blev 3 µg pKYP10-DNA opløst i 40 µl (totalvolumen) af en opløsning indeholdende Y-100 pufferopløsning, og 5 enheder HindIII og 5 enheder BamHI blev tilsat. Nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Fra reaktionsopløsningen blev der opnået ca. 1,8 µg af et DNA-fragment på ca. 4,3 kb indeholdende P_{trp} ved LGT-metoden.

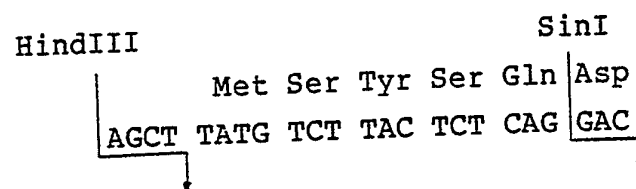
Modent humant IFN- γ -polypeptid har den N-terminale struktur Cys-Tyr-Cys-. For at ændre den 1. og den 3. aminosyre (Cys) til Ser og til tilvejebringelse af en initieringscodon (ATG), der er nødvendig for udtrykkelse, lige før den første Ser, blev følgende DNA-linker syntetiseret:



To enkeltkædede DNA'er, en 20-mer og en 19-mer, blev syntetiseret ved en konventionel triestermetode. Derpå blev 2 µg af den 20-mer og 2 µg af den 19-mer DNA opløst i 40 µl (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA og 1 mM ATP. 30 enheder T4 polynukleotidkinase blev tilsat, og phosphoryleringsreaktion blev udført ved 37 °C i 60 minutter.

Derpå blev 0,4 µg af *SinI*-*BamHI*-fragmentet på ca. 850 bp afledt fra pGBD1 og 1,0 µg af *HindIII*-*BamHI*-fragmentet på ca. 4,3 kb af udtrykkelsesvektoren pKYP10, som blev opnået i det foregående, opløst i 25 µl T4 ligasepuffer-opløsning. Ca. 0,1 µg af DNA-linkeren som nævnt i det foregående blev sat til blandingen efterfulgt af tilsætning af 6 enheder T4 DNA-ligase. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer.

Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den resulterende rekombinante plasmidblanding til opnåelse af en Ap^R koloni. Et plasmid pGVK13, som vist i fig. 4, blev isoleret fra dyrkningsbouillon for kolonien. Strukturen af pGVK13 blev bekræftet ved nedbrydning med *EcoRI*, *HindIII*, *ClaI* og *BamHI* og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved Maxam-Gilbert-metoden, at DNA-sekvensen fra *HindIII*-stedet til *SinI*-stedet i plasmidet pGVK13 var som følger:



Det humane IFN-γ-polypeptid, som pGVK13 koder for (derivatet kaldes 1,3-Ser-IFN-γ), er forskelligt fra det kendte humane IFN-γ-polypeptid derved, at den 1. og den 3. aminosyre (Cys) i det modne humane IFN-γ er erstattet med Ser. Escherichia coli stamme indeholdende plasmid pGVK13 er blevet deponeret hos FRI som Escherichia coli IGVK13 (FERM BP-432).

P a t e n t k r a v :

1. Derivat af et humant interferon- γ -polypeptid med
5 formlen 137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146), 1-Ser-137-Cys-IFN- γ -
(Δ 138-146) eller 3-Ser-137-Cys-IFN- γ (Δ 138-146), der kodes
af henholdsvis rekombinant plasmid pGVT137 (FERM BP-547),
pGNC5 (FERM BP-550) og pGNB4 (FERM BP-549).
- 10 2. Rekombinant plasmid pGVT137 (FERM BP-547), pGNC5
(FERM BP-550) og pGNB4 (FERM BP-549).
3. Mikroorganisme transformeret med et rekombinant
plasmid ifølge krav 2, hvilken mikroorganisme er
15 Escherichia coli IGVT137 (FERM BP-547), Escherichia coli
IGNC5 (FERM BP-550) eller Escherichia coli IGNB4 (FERM
BP-549).
4. Fremgangsmåde til fremstilling af et humant
20 interferon- γ -polypeptid ifølge krav 1, der omfatter
dyrkning i et medium af en mikroorganisme ifølge krav 3,
idet mikroorganismen er i stand til at udtrykke det
inkorporerede DNA-fragment, akkumulering af polypeptidet
i dyrkningsmediet og udvinding af polypeptidet derfra.

25

30

35

FIG. 2

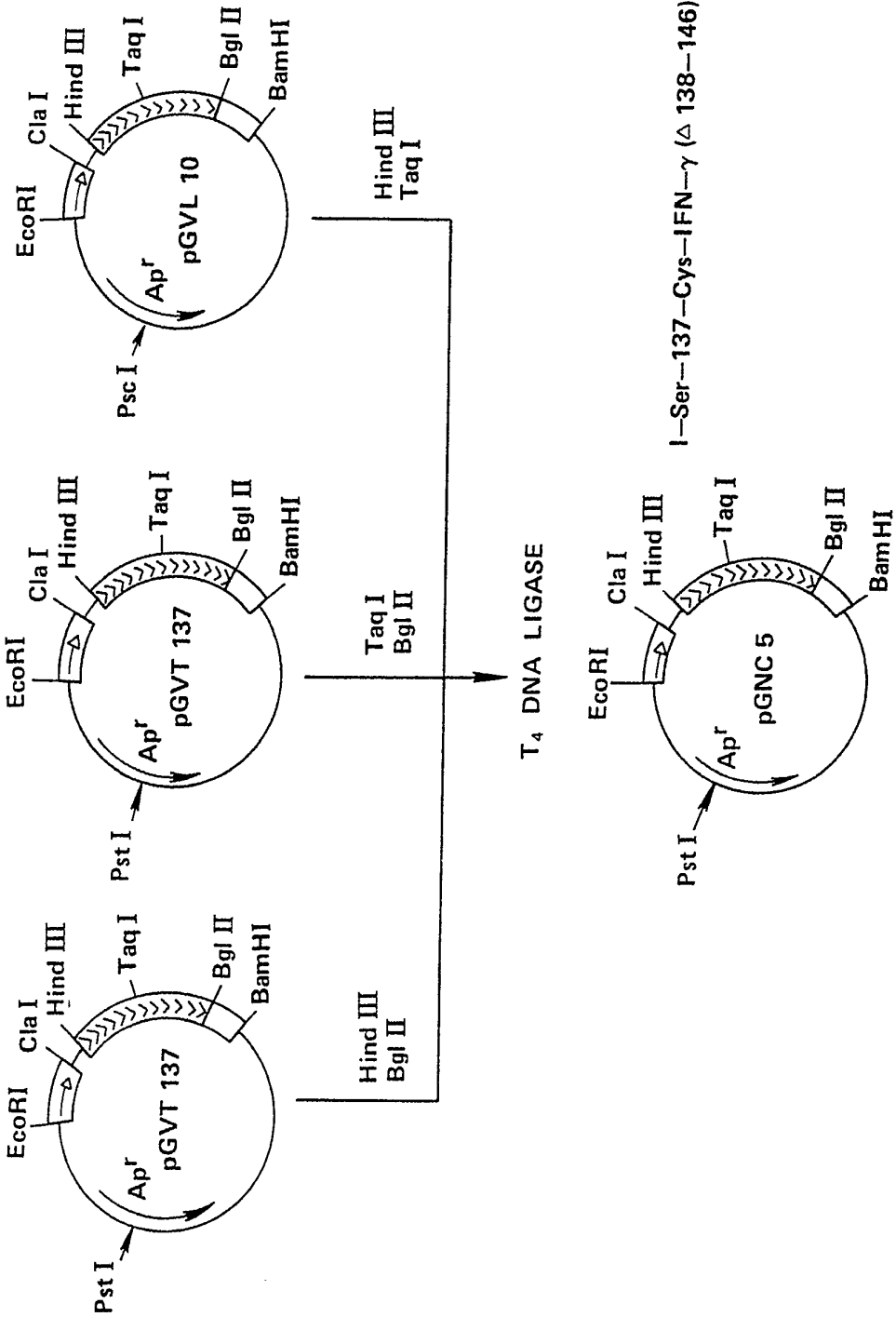


FIG. 3

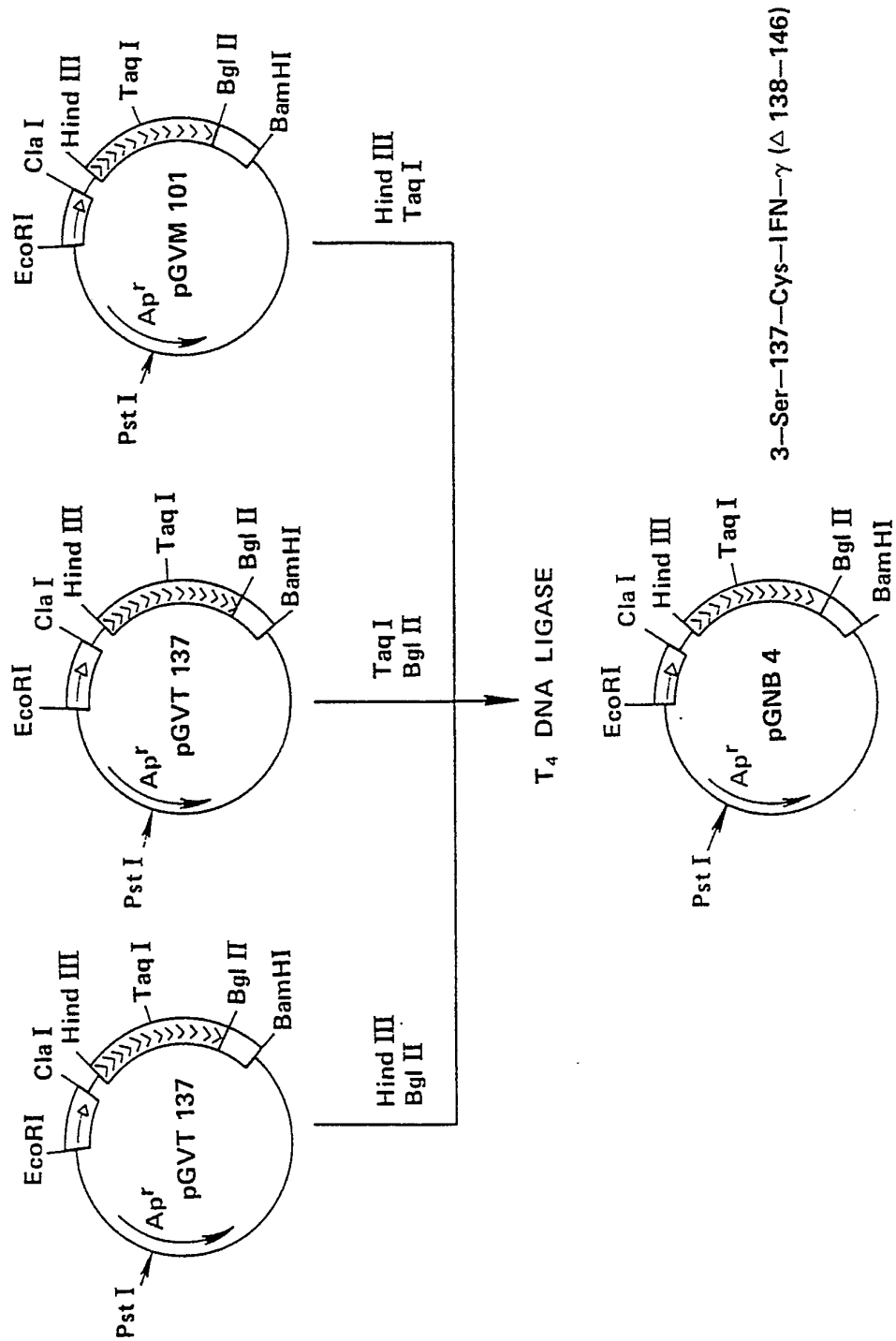


FIG. 4

