

(19) HU

MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

B

(11)

196462

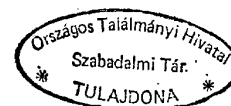
Bejelentés napja: (22) 1984.09.19. (21) (3511/84)

Nemzetközi
osztályozás:
(51) NSZO
C 12 P 21/02
C 12 N 1/06

Elsőbbsége: (33) US: (32) 1983.09.20.
(31) (534 039)

Közzététel napja: (41) (42) 1985.06.28.

Megjelent: (45) 1989.05.31.



Feltaláló: (72)
Kung Hsiang-Fu, Verona, New Jersey, US

Szabadalmas: (73)
F. Hoffmann-La Roche et Co., AG.,
Bázel, CH

(54) ELJÁRÁS IMMUN INTERFERON ELŐÁLLÍTÁSÁRA

1

(57) KIVONAT

A találmány tárgya eljárás

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

intakt rekombináns humán immun interferon
extrakciójára a fenti fehérjét tartalmazó
transzformált mikroorganizmusokból, oly mó-
don, hogy a transzformált mikroorganizmust
valamely proteáz inhibitorral extraháljuk.

196462

Találmányunk tárgya eljárás immun interferon előállítására. Találmányunk tárgya közelebbről eljárás rekombináns humán immun interferon intakt szekvencia formájának extrakciójára a fenti fehérjét magábanfoglaló transzformált mikroorganizmust tartalmazó készítményből. Az extrakciót olyan reagenssel (pl. guanidin-hidroklorid) végezzük el, amely a proteáz enzim-aktivitást gátolja, ugyanakkor azonban a kívánt fehérje aktivitását nem befolyásolja. A guanidin-hidrokloriddal történő extrakció után következő tisztítási lépések a fehérjék tisztításában járatos szakember számára jól ismertek.

Az ábrák rövid ismertetése

Az 1. ábrán tisztított rekombináns humán immun interferon nátrium-dodecil-szulfát-poliakrilamid gél elektroforézisét (a továbbiakban SDS-PAGE) mutatjuk be redukzív (A; 0,7 mól β -merkapto-etanol) és nem redukáló (B) körülmények között.

A 2. ábrán a rekombináns humán immun interferon várható aminosav-frekvenciáját a 15K és 18K rIFN- γ species tényleges DNS szekvenciájával hasonlítjuk össze.

A 3. ábrán a 15K és 18K rIFN- γ C-terminális peptidjeinek HPLC elválasztását mutatjuk be CNBr kezelés után.

Az irodalomban számos módszert ismertettek az interferon néven ismert vírus-ellenes fehérje-család extrakciójára és tisztítására. Jelen ismereteink szerint három főbb interferon-típust különböztetünk meg: IFN- α (leukocita), IFN- β (fibroblaszt) és IFN- γ (immun). Bár a különböző interferon-típusok vírus-ellenes és burjánzásgátló hatásuk vagy szerkezeti felépítésük alapján összefüggnek, az irodalomban eddig egyetlen egységes módszert sem ismertettek mindhárom interferon-típus extrakciójára és tisztítására. A leukocita-interferonnak más fehérjéket és sejtmaradványokat tartalmazó nyers keverékből történő extrakciójára és tisztítására felhasználható módszerek valójában nem alkalmasak fibroblaszt vagy immun interferonnak ugyanezen készítményből történő extrakciójára és tisztítására.

Az ismert tisztítási eljárások extrakciós lépése során a mikroorganizmust mechanikus (azaz szonifikáció) vagy kémiai lizisnek vetették alá, amelynek során - gyakran rekombináns módszerek útján - nyerték a kívánt 'idegen' fehérjét. A mechanikai vagy kémiai lizis-módszerek során azonban a keverékbe különböző sejt-proteázok is belekerülnek. E proteázok ezután enzimes behatás révén lebontják a keverékben levő 'idegen' fehérjét. E proteázok ezért megakadályozhatják vagy gátolhatják az 'idegen' fehérje teljes vagy érett és biológiailag aktív formájának homogén szintig történő tisztítását.

Találmányunk célkitűzése az ismert extrakciós módszerek hátrányainak kiküszöbölése és immun interferon intakt szekvenciájának előállítására, amelynek során a proteolitikus lebontásból származó fragmenseket a tisztított immun interferon készítményből eltávolítjuk.

10 A találmány előnyös foganatosítási módjainak ismertetése:

Azt találtuk, hogy immun interferon esetében a szokásos extrakciós módszerekkel (pl. az irodalomban leírt szonifikáció vagy mechanikai lizis) nem nyerhető intakt vagy teljes aminosav-szekvenciával rendelkező immun interferon. A rekombináns technológia csupán a közelmúltban ért el olyan fejlettségi fokot, amelynek segítségével a jellemzéshez és aminosav-szekvencia meghatározáshoz elegendő mennyiségű rIFN- γ állítható elő. Az rIFN- γ készítmények szokásos módszerekkel történő extrakciója és a tisztított anyag aminosav-szekvenciájának meghatározása során azt találtuk, hogy a tisztított készítmény többfajta különböző molekulatömegű fehérje-speciest tartalmaz. Az aminosav-szekvencia meghatározása azt mutatta, hogy ezek a fehérje-speciesek ténylegesen az immun-interferon intakt szekvencia formájának az intakt szekvencia fehérjék proteolitikus fragmentjeivel képezett kombinációjából állnak. Az ismert eljárásokkal tehát nem extrahálható és tisztítható az immun interferon más proteolitikus fragmenseitől mentes homogén immun interferon.

Azt találtuk, hogy a rIFN- γ bomlása meggátolható olyan reagenssel (pl. guanidin-hidroklorid) amely a proteáz vagy enzim aktivitást gátolja, ugyanakkor azonban a tisztítási eljárás kezdeti extrakciós lépésben a rIFN- γ aktivitást nem befolyásolja és ily módon homogén és intakt molekulák nyerhetők. A fagyasztott sejtek guanidin-hidroklorid távollétében történő szonifikációja során főként olyan proteolitikus terméket kapunk (15K rIFN- γ), amelyben a IFN- γ 132-146. sz. C-terminális aminosav-maradékai hiányoznak. Az intakt molekula aminosav-összetétele és N-terminális szekvenciája a DNS-szekvencia alapján várhatóan felel meg. A rIFN- γ DNS-bázis szekvenciája az 1. számú irodalmi helyen került ismertetésre és a leírásban erre hivatkozunk.

Meglepő módon azt találtuk, hogy az immun interferon biológiai aktivitását a guanidin-hidrokloridos extrakciós lépés után is megtartja annak ellenére, hogy az immun interferon tisztított mintájához adott guanidin-hidroklorid a biológiai aktivitást tönkreteszi. A találmányunk szerinti eljárás előnyös foganatosítási módja szerint a transzformált mikroorganizmusokat guanidin-hidrokloridban szuszpendáljuk.

A találmányunk szerinti eljárásnál anti-proteolitikus ágensként bármely guanidinium-sót felhasználhatunk. Guanidinium-sóként szerves savakkal (pl. ecetsavval) vagy ásványi savakkal (pl. hidrogén-halogenidekkel, mint pl. sósavval, hidrogén-bromiddal, hidrogén-fluoriddal és hidrogén-jodiddal) képezett sókat egyaránt felhasználhatunk. Guanidinium-sóként előnyösen guanidin-hidrokloridot alkalmazhatunk. A guanidinium-só koncentrációja a mikroorganizmus kezelésnél nem döntő jelentőségű tényező és bármely hatásos koncentráció érték lehet. A mikroorganizmust előnyösen a guanidinium-só 3-7 mól/liter koncentrációjú oldatával kezelhetjük, és 1 g transzformált mikroorganizmusra vonatkoztatva kb. 3-9 térfogat rész só-oldatot alkalmazhatunk. A só-koncentrációt oly módon állíthatjuk be, hogy a só megfelelő mennyiségét alkalmas oldószerben felvesszük. Oldószerként pl. vizet vagy vizes puffereket (pl. ammónium-acetátot vagy piridin/ecetsav elegyet stb.) alkalmazhatunk. A szakember számára előrelátható, hogy a találmányunk szerinti eljárásnál más proteáz inhibitor reagensek is felhasználhatók (pl. karbamid vagy tiocianát).

A tisztított rIFN- γ -t végül oly módon nyerjük, hogy az E. Coli felülűszót extrakció és megfelelő hígítás után közvetlenül tisztítjuk - előnyösen monoklonális anti-test tisztítási lépés segítségével. Az extrakció és a tisztítási eljárás a nagyleptékben történő termelés céljainak megfelelően automatizálható. Találmányunk segítségével ily módon első ízben nyílik lehetőség nagymennyiségű homogén rIFN- γ előállítására és ezáltal kiterjedt klinikai vizsgálatok, biológiai kísérletek, röntgen-krisztallográfiai és szerkezet-funkció tanulmányok elvégzésére.

A találmányunk szerinti eljárással előállított intakt rekombináns humán immun interferon képlete a következő:

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

Eljárásunk további részleteit a leírás alábbi részében és a példákban ismertetjük.

Az E. Coli által termelt rekombináns humán immun interferont előnyösen fagyasztott sejtpépből 7 mól/liter koncentrációjú guanidin-hidrokloriddal extraháljuk és megfelelő tisztítási eljárásokkal tisztítjuk (pl. monoklonális anti-test affinitás oszlopon). A kb.

18000 dalton (18K) látszólagos molekulatömegű tisztított interferont (SDS-PAGE alapján) guanidines extrakcióval nyerjük, míg az alacsony molekulatömegű speciést (a fő-species molekulatömege kb. 15000 dalton, 15K) guanidin távollétében történő szonifikációval izoláljuk. Mind a 18K mind a 15K fehérjék amino-terminális szekvenciája összhangban áll a humán immun interferon fehérje DNS szekvencia kódolása alapján várható szekvenciával.

A C terminális frekvenciát oly módon határozzuk meg, hogy a tisztított C-terminális peptidet CNBr kezelés után analizáljuk és szekvenciáját meghatározzuk. A 18K rIFN- γ -ből felszabadított C-terminális peptid aminosav-összetétele és szekvenciája a rIFN- γ előrelátható szekvenciájának felel meg, ami azt jelenti, hogy a 18K species az intakt molekula. Másrésztől CNBr kezelés hatására a 15K rIFN- γ C-végcsoportjából különböző peptid-fragmensek szabadulnak fel. Aminosav- és szekvencia-analízis alapján e különböző peptidok a 121-131 sz. aminosav-maradékoknak felelnek meg, ami azt mutatja, hogy a 15K species a proteolitikus termék.

A találmányunk szerinti eljárás előnyös foganatosítási módja szerint a fermentációs műveletnél recipiensként az Escherichia coli K-12 294 törzset alkalmazzuk, feltéve, hogy mást nem közlünk. Ezt a törzset a 2 055 382A sz. brit szabadalmi bejelentésben irták le és az American Type Culture Collection intézménynél 1978. október 28-án ATCC 31 446 számon deponálták. Minden rekombináns DNS műveletet a National Institutes of Health irányelveinek megfelelően végeztünk el.

Találmányunkat azonban nem korlátozzuk a fent említett E. coli K-12 294 törzs alkalmazására, hanem eljárásunk során más ismert E. coli törzsek (pl. E. coli MA210 vagy E. coli RR1 /ATCC 31 343/) vagy más mikroorganizmusok is felhasználhatók, amelyek sok képviselője bárki számára hozzáférhető vagy deponálásra került és elismert mikroorganizmus létbehelyező intézmények útján beszerezhető (pl. American Type Culture Collection, lásd ATCC katalógus).

A rIFN- γ C-végcsoportjának utolsó 16 aminosav-maradékból (azaz 131-146 sz. aminosavak maradékból) álló szintetikus polipeptid monoklonális anti-testjeit állítjuk elő. A rIFN- γ tisztítására az egyik monoklonális anti-testet alkalmazzuk (Mo γ 2-11.1). A találmány során a monoklonális anti-testeket és az anti-test affinitásos oszlopot a 103 898 sz. európai szabadalmi leírásban foglaltak szerint készítjük el. Eljárásunk további részleteit az alábbi példákban ismertetjük.

1. példa

Antigénként használt hordozófehérje-polipeptid komplex szintézise

A H-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Met-Leu-Phe-Arg-Gly-Arg-Arg-Ala-Ser-Gln-OH polipeptidet thyro-globulinnal (a továbbiakban TG) kapcsoljuk Goodfrien és társai módszerével (Science 144, 1334 /1964/).

Magát a peptidet szokásos peptid-szintetikus módszerekkel állíthatjuk elő. A szilárdfázisú és folyadékfázisú módszert egyaránt felhasználhatjuk, bár sok esetben a folyékony fázisú szintetikus módszer előnyös. Megfelelő peptid-szintéziseket pl. az alábbi irodalmi helyek irtak le: Schröder és Lübke: „The Paptides”, Vol. 1. Academic Press, New York, USA, 1966; vagy Izumiya és társai: „Peptide Syntheses”, Maruzen, Tokyo, Japan, 1975; vagy Haruaki Yajima: „Experiments in Biochemistry”, Vol. 1. 207-400 oldalak, Tokyo Kagaku Dojin, 1977. E módszerek közül - többek között - az azidos, kloridos, savanhidrides, vegyes savanhidrides, DCC és aktív észteres módszereket, a Woodward K.-reagenst felhasználó módszert, a karbodiimidazolozó módszert, az oxidációs-redukciós módszert és a DDCC/addíciós (pl. HONB, HOBt, HOSu) módszert említjük meg.

Az IFN- γ 131-146, fragmensének részletes előállítása a 103 898 sz. európai szabadalmi leírásban került ismertetésre. 2,5 mg fenti polipeptidet 3,75 mg TG-vel összekeverünk, majd 2 ml 50 millimólos foszfát-puffert adunk hozzá és az elegyet jegesvízben erőteljesen keverjük. Ezután fokozatosan 30,4 mg karbodiimid-hidroklorid és 200 ml desztillált víz oldatát csepegtetjük hozzá. A reakció befejeződése után desztillált vízzel szemben 24 órán át dializáljuk, majd liofilizáljuk. 4,7 mg fehérje-komplexet kapunk.

2. példa

Enzimhez kötött antigén előállítása az enzim immunológiai meghatározáshoz (EIA) az antitest kimutatásához

Az EIA számára az enzimhez kötött antigént Kitagawa és tsai módszerével állítjuk elő (Journal of Biochemistry 79, 233 /1976/).

(i) A maleimido-csoport bevitele a polipeptidbe.

Az 1. példa szerint előállított polipeptidet (350 nmól) 1 ml 100 mmólos foszfát-pufferben oldjuk (pH 6,8) és az oldatot 585 μ g (1,75 μ mól) N-(4-karboxi-ciklohexil-metil)-maleimid N-hidroxi-szukciimid-észternek 70 μ l N,N-dimetil-formamiddal képezett oldatához adjuk. Az elegyet 30 °C-on 30 percen át keverjük. A reakció befejeződése után Sephadex G-25 oszlop felhasználásával kromatografálva 185 nmól, bevitt maleimido-csoportot tartalmazó polipeptid frakciót kapunk.

(ii) A maleimido-csoportot tartalmazó polipeptid β -D-galaktózidázzal történő kapcsolása.

A maleimido-csoportot tartalmazó polipeptidet (16,5 nmól) 3,3 nmól β -D-galaktózidázzal elegyítjük. A reakciót 4 °C-on 18 órán át végezzük, majd 412,5 nmól β -merkaptot-etanol hozzáadásával leállítjuk. A β -D-galaktózidázzal kapcsolt polipeptidet Sepharose 6B oszlopon frakcionáljuk és a további kísérletekben felhasználjuk.

3. példa

Immunizálás

6 db 7-8 hetes BALB/C egeret 40 μ g (fehérjében kifejezve) az 1. példa szerint előállított fehérje-komplex mint antigén Freund-féle teljes adjuvánszal képezett bensőséges keverékével szubkután inokulálunk (primer immunizálás). A primer immunizálás után két héttel az egereket a fentivel azonos dózisu antigén Freund-féle nem-teljes adjuvánszal képezett bensőséges keverékével szubkután ismét inokuláljuk (szekunder immunizálás). További két hét elteltével a második immunizálással azonos módon harmadik immunizálást hajtunk végre. A harmadik immunizálás után 6 nappal az egerekből részleges vérmintát veszünk és a szérum-antitest titereket az alábbiakban ismertetésre kerülő EIA-módszerrel meghatározzuk (lásd: Immunopharmacology 1, 3 /1978/). A legmagasabb antitest-titert mutató γ -2 számú egeret 120 μ g antigén 0,5 ml vizes nátrium-kloriddal képezett oldatának intravénás inokulálásával végső immunizálásnak vetjük alá. Az egyes egerek antitest-titer adatait az 1. táblázatban foglaljuk össze.

1. táblázat

Immunizált egerek anti-peptid-antitest titere

Az egér száma	B/T (%)		
	Első immu- nizálás 1/	Második immu- nizálás 2/	Harmadik immu- nizálás 3/
γ-1	- 4/	N.D.	24.5
2	N.D. 5/	19.3	35.3
3	-	N.D.	24.7
4	N.D.	1.3	1.7
5	N.D.	1.8	5.0
6	-	N.D.	0.8
normál egér	0.6	0.1	N.D.

1/ Szérum hígítás aránya: 1/1000

2/ Szérum hígítás aránya: 1/6300

3/ Szérum hígítás aránya: 1:7800

4/ -: nem kimutatható

5/ N.D.: nem határoztuk meg

B/T: (kötött enzim aktivitás/teljes hozzáadott enzim aktivitás) x 100

EIA-módszer

A 2. példa szerint előállított fehérje-komplexel immunizált egerek szérumban vagy a hibridoma felülűszóban levő antitest-aktivitást EIA-módszerrel határozzuk meg. (Immunology 1, 3 /1978/). A szérumot vagy a hibridoma felülűszót A-pufferrel (20 mM Na₂HPO₄, 100 mM NaCl, 0,1% NaN₃, 1 mM MgCl₂, pH 7,0) hígítjuk, majd a hígított elegy 100 µl-es részletét 100 µl enzimhez kötött polipeptid-származékkal (2. példa) elegyítjük és a reakciót 24 °C-on 24 órán át folytatjuk. Ezután 100 µl 3%-os, nyúl anti-egér IgG-vel kapcsolt cellulózt adunk hozzá és a reakciót 24 °C-on 4 órán át folytatjuk. A reakció befejeződése után a cellulózt 0,5% Tween 20-t tartalmazó A-pufferrel alaposan mossuk, majd 500 µl 20 µg/ml-es 4-metil-umbelliferi-β-D-galaktozidot adunk hozzá. A reakciót 37 °C-on 2 órán át végezzük, majd 3 ml 100 mmólos karbonát-puffer (pH 10,5) hozzáadásával leállítjuk. A fluoresszencia intenzitást fluoromé-
terre mérjük, (gerjesztés 365 nm; emisszió 450 nm).

4. példa

Sejt-fúzió

A 3. példában leírt végső immunizálás után három nappal a γ-2 egér lépét kivágjuk, rozsdamentes szűrőn nyomás alatt át-szűrjük és Eagle-féle minimális esszenciális közegben (MEM) szuszpendáljuk. Ily módon lép-sejt szuszpenziót nyerünk. A sejt-fúzióhoz BALB/C egérből származó P3-x63.Ag8.U1

20 (P3U1) mieloma-sejteket alkalmazunk. (Current Topics in Microbiology and Immunology 81, 1 /1978/). A sejt-fúziót Köhler és Milstein eredeti módszerével végezzük el (Nature 256, 495-497 /1975/). A lépsejteket és P3U1 sejteket külön-külön szérum-mentes MEM-el háromszor mossuk és 5 : 1 arányban (a sejtek számában kifejezve) összekeverjük. Az elegyet 800 fordulat/perc sebességgel 15 percen át centrifugáljuk, ezalatt a sejtek kiülepednek. A felül elhelyezkedő folyadék alapos eltávolítása után az üledéket enyhén fellazítjuk, 0,3 ml 45%-os polietilén-glikol (PEG) 6000-t (Koch) adunk hozzá és az elegyet 37 °C-on meleg víztartályban 7 percen át állni hagyjuk, mikoris a sejt-fúzió lejátszódik. Ezután 2 ml/perc sebességgel MEM-t adunk hozzá. Az összesen 12 ml MEM hozzáadása után kapott elegyet 600 fordulat/perc sebességgel 15 percen át centrifugáljuk, majd a felül elhelyezkedő folyadékot eltávolítjuk. A sejt-üledéket 10% magzati borjú szérummal kiegészített RPMI-1640 táptalajban (RPMI1640-10FCS) szuszpendáljuk 2 x 10⁵ P3U1 sejt/ml koncentrációban és 24-mélyedéses multi-csészékben (Linbro) levő 144 mélyedést 1 ml szuszpenzióval beoltunk. A beoltás után a sejteket 37 °C-on 5% szén-dioxid-gázt tartalmazó inkubátorban 37 °C-on inkubáljuk. 24 óra elteltével HAT-szelektív tenyésztést indítunk meg oly módon, hogy HAT-tal (1 x 10⁻⁴ M hipoxantin, 4 x 10⁻⁷ M aminopterin, 1,6 x 10⁻⁵ M timidin) kiegészített RPMI1640-10FCS táptalajt adunk hozzá, 1 ml/mélyedés mennyiségben. A HAT-szelektív tenyésztést folytatjuk, miközben a starttól számított 3, 5. és 7. napon 1 ml régi tenyészetet 1 ml HAT-közegre cserélünk le. A hibridómák növekedését a sejt-fúzió után 10-14 nappal figyeljük meg. Mihelyt a fermentlé színe sárgába megy át (kb. 1 x 10⁶ sejt/ml) a felülűszót összegyűjtjük és az anti-test jelenlétében az EIA-módszerrel megvizsgáljuk. A fenti módon 144 olyan mélyedést vizsgálunk meg, amelyben hibridoma növekedést megfigyeltünk. Két mélyedésben (γ 2-11 és γ

2-100) intenzív antitest-aktivitást, míg két másik mélyedésben (γ 2-62 és γ 2-70) gyenge antitest-aktivitást figyeltünk meg.

5. példa

Klónozás

Három mélyedésből (γ 2-11, γ 2-62 és γ 2-100) származó, pozitív antitest-aktivitást mutató mélyedésből származó hibridómákat a hatáshígításos módszerrel klónozzuk. A hibridóma sejteket RPMI1640-20FCS-ben legalább

2-hibridóma sejt/ml koncentrációban szuszpendáljuk és a szuszpenziót 96-mélyedést tartalmazó mikrolemez mélyedései között 0,1 ml részletekben elosztjuk. A fenti elosztásban tápsejtként minden mélyedéshez 5×10^5 BALB/C egér timocitát adunk. A fentiek eredményeként a sejtburjánzás kb. 2 hét múlva figyelhető meg. A felülúszót összegyűjtjük és az anti-testek jelenlétét a 3. példában leírt EIA-módszerrel meghatározzuk. Antitest aktivitást tapasztalunk γ 2-11 mélyedés 19 klónja közül 8-ban, a γ 2-62 mélyedés 54 klónja közül 3-ban, és a γ 2-100 mélyedés 47 klónja közül 5-ben (2. táblázat).

15

2. táblázat

Klónozott hibridómák anti-peptid anti-test aktivitása

Hibridóma száma	B/T (%)
γ 2-11	
1	68
2	31
3	63
6	68
7	67
9	69
12	42
18	60
γ 2-62	
14	20
16	21
34	16
γ 2-100	
2	69
3	70
16	56
25	80
46	33
Hiperimmun egér szérum	35

6. példa

Monoklonális antitestek IFN- γ -hez való kötődési kapacitása

A monoklonikus antitestek IFN- γ -hez való kötődési kapacitását az alábbi módszerrel határozzuk meg. Nyúl anti-egér IgG antitesttel kapcsolt cellulóz 3%-os oldatához (300 μ l) a γ 2-11, γ 2-62 és γ 2-100 sejtek 3 klónozott sejtvonal tenyészetének felülúszóját (300 μ l) adjuk és a reakciót szobahőmérsékleten 12-20 órán át folytatjuk. A cellulózt ezután fiziológiai konyhasó-oldattal alaposan mossuk és az alábbi eljárással nyert IFN- γ -

50

ból 550 ml-t adunk hozzá. A felülúszót 3-4 órás reakció után összegyűjtjük és az alábbi eljárással nyert IFN- γ -t adunk hozzá. A felülúszót 3-4 órás reakció után összegyűjtjük és az IFN- γ aktivitást a citopikus hatás (CPE) leolvasó módszerrel mikrolemez felhasználásával meghatározzuk. (Applied Microbiology 16, 1706 /1968/). 96 mélyedést tartalmazó mikrolemez minden mélyedésébe 50 μ l MEM-t helyezünk és az első mélyedésbe 50 μ l IFN mintát adunk, majd kétszeres sorozathígítást alkalmazunk. Minden mélyedéshez 50 μ l WISH-féle sejt-szuszenziót (4×10^5 sejt/ml) adunk 20% FCS-t tartalmazó MEM-ben és az inkubálást szén-dioxid gáz inkubátorban

55

60

65

37 °C-on 24 órán át folytatjuk. Ezután minden mélyedéshez 2000 TCID₅₀ (TCID₅₀ = közepepes sejttenyészet fertőző dózis) koncentrációra beállított 50 µl vesiculáris stomatitis vírus (New Jersey törzs) készítményt adunk és az inkubálást szén-dioxid inkubátorban 37 °C-on folytatjuk. Mintegy 35 óra elteltével, amikor az IFN mintát nem tartalmazó mélyedésben levő sejtek 100%-os CPE-t mutatnak, minden mélyedést a CPE meghatározása céljából mikroszkópiusan megvizsgáljuk és az 50%-os CPE-t mutató mélyedésben levő IFN-minta hígítási faktorának reciprokát tekintjük IFN-titernek.

IFN-γ minta gyanánt a humán perifériális limfociták 40 µg/ml concanavalin A-val és

15 ng/ml 12-O-tetra-dekonal-forból-13-acetáttal történő stimulálása után 72 órával összegyűjtött felülúszót alkalmazunk. A fenti felülúszó tenyészet minden ml-re 4400 egység humán IFN-γ-t (hővel és savval szemben labilis) tartalmaz. Ha az IFN-γ-hoz kötődő kapacitást mutató anti-testek vannak jelen a klónozott sejt-tenyészet felülúszóban, úgy a hozzáadott IFN-γ-nak a cellulózon az anti-testekhez kell kötődni és a felülúszó IFN-γ-aktivitásának csökkenni kell. A γ 2-11 klón esetében az IFN-γ-hoz való viszonylag intenzív kötődő kapacitás figyelhető meg és a hozzáadott IFN-γ (550 E/ml) 50-75%-a az anti-testekhez kötődik (3. táblázat).

3. táblázat

Monoklonális anti-testek IFN-γ aktivitást megkötő hatása

Hibridóma tenyészet	Maradék IFN aktivitás (E/ml)	
	1. kísérlet	2. kísérlet
γ 2-11.1	138	275
γ 2-11.2	207	N.D.
γ 2-11.6	N.D.	275
γ 2-62.2	275	550
γ 2-62.3	275	550
γ 2-100.2	550	N.D.
γ 2-100.3	550	N.D.
-	550	550

7. példa

Monoklonális antitest-termelő hibridómák ascites képzése

Az ascites-képződést oly módon idézzük elő, hogy 0,5 ml ásványolajjal intraperitoniálisan előkezelt BALB/C egereket 1×10^6 γ 2-11.1, IFN-γ aktivitást megkötő anti-testek termelésére képest klón-sejtekkel intraperitoniálisan inokulálunk. A hibridómák intraperitoniális beadása után 10 nappal az ascitikus folyadékot le vesszük és az antitest-aktivitást 10^7 -szeres hígításig megvizsgáljuk. A megfelelő klón sejt-tenyészet felülúszó esetében anti-test aktivitás 10^4 -szeres hígításig figyelhető meg, ugyanakkor az ascites-képződés (ascitizáció) az anti-test aktivitás kb. 1000-szeres növekedéséhez vezet.

45

8. példa

Monoklonális anti-test tisztítás

Kiindulási anyagként 4 ml, a 7. példa szerinti kapott ascitikus folyadékot használunk és a monoklonális anti-test tisztítást Staeelin és tsai módszerével végezzük el. (Journal of Biological Chemistry 256, 9750 /1981/). Az ascitikus folyadékot a fibrin-szerű anyagok eltávolítása céljából előbb 10000 fordulat/perc sebességgel 15 percen át centrifugáljuk, majd foszfát-só pufferrel (PBS: 8,1 mM NaH₂PO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, 2,7 mM KCl, 137 mM NaCl; pH 7,2) olyan koncentrációra hígítjuk, hogy az ultraibolya abszorpció 280 nm-nél (A₂₈₀) 12 és 14 közötti érték legyen. A hígított mintához telített vizes ammónium-szulfát-oldatot adva a szulfát-koncentrációt 47%-ra állítjuk be. Az elegyet 4 °C-on 60 percen át keverve elvégezzük a

55

60

65

kisózást, majd centrifugáljuk (1000 fordulat/perc, 15 perc). A kapott csapadékot 50 mmól nátrium-kloridot tartalmazó 20 mmól trisz-pufferben (pH = 7,9) oldjuk és 2 l fenti pufferrel szemben dializáljuk. 2 óra múlva a dializáló oldatot ugyanezen összetételű oldat friss 2 literes mennyiségével lecseréljük és a dializist további 15 órán át folytatjuk. A kiváló csapadékot centrifugálással (10000 fordulat/perc, 15 perc) eltávolítjuk és a felül-
5
10

szót olyan koncentrációra állítjuk be, hogy az A₂₈₀ 20-30 közötti érték legyen.
A mintát 50 mmól nátrium-kloridot tartalmazó megfelelő mennyiségű trisz-pufferrel (pH = 7,9) egyensúlyba hozott DEAE-cellulóz oszlopon (8 ml, Wattman DE52) frakcionáljuk; az eluálást 50 mmól nátrium-kloridot tartalmazó trisz-pufferrel, 1,5 ml/perc átfolyási sebességgel végezzük el. A fenti körülmé-
15
20

nyek között anti-test aktivitást főként a kifolyó frakciókban tapasztalunk. A SDS-PAGE-módszerrel (Laemlie és tsaí: Nature 227, 680 /1970/) igazoljuk, hogy a tisztított minta ténylegesen az anti-test. Az ammónium-szulfátos kisózással és DEAE-cellulóz frakcionálással kapott frakciók közül néhányat 2-merkapto-etanolal redukálunk, majd 17%-os SDS gél-elektroforézisnek vetünk alá 24 órán át 30 volt feszültség mellett. Az anti-test aktivitás csúcsoknak megfelelően két sávot tapasztalunk, a kb. 55 kilodalton (H lánc) és kb. 28 kilodalton (L lánc) molekulatömegeknek megfelelő helyzetekben. Az ily módon tisztított anti-test frakció 17 IFN- γ -megkötő kapacitásának meghatározása céljából IFN- γ -t adunk hozzá (2200 U/ml). Azt találtuk, hogy az IFN- γ kb. 50%-a az anti-testhez kötődik (4. táblázat).

4. táblázat

Minta	Hígítás	Maradék IFN aktivitás (U/ml)
γ 2-11.1 frakció 17	10 ⁻¹	1100
	10 ⁻²	1100
	10 ⁻³	2200
	10 ⁻⁴	2200
Anti-IgE monoklonális anti-test	10 ⁻¹	2200
	10 ⁻²	2200
	10 ⁻³	2200
	10 ⁻⁴	2200

9. példa

A1-osztály, amelyhez a monoklonális anti-testek tartoznak

Tisztított anti-test frakciót (17 jelű) (8. példa) 10-szeresére hígítunk és agaron immuno-kicsapásos reakciónak vetjük alá (Ouchterlony teszt: Immunological Methods, Gel-Diffusion Techniques, Blackwell, Oxford, 1964) kecske anti-egér IgG1, G2a, G2b és G3
50
55

anti-testeket (Miles) alkalmazva úgy, hogy olyan IgG al-osztály legyen azonosítható, amelyhez γ 2-11.1 monoklonikus anti-testek tartozhatnak. A monoklonális anti-test és a kecske anti-egér IgG2b anti-test között egyetlen különálló sáv található, míg a monoklonális anti-test és a többi anti-anti-test között nem figyelhető meg sávképződés. Ennek megfelelően a monoklonális anti-test az IgG2b-hez tartozik (5. táblázat).

5. táblázat

Monoklonikus anti-test al-osztály

Antigén	Anti-test	Kicsapásos görbe
Találmányunk szerinti monoklonális anti-test		
(Frakció 17)	Anti-IgG1	-
(Frakció 17)	Anti-IgG2a	-
(Frakció 17)	Anti-IgG2b	+
(Frakció 17)	Anti-IgG3	-

10. példa

A 8. példa szerinti eljárással tisztított kifolyó frakciókból 25 ml (65,3 mg) monoklonális anti-testet egy éjjelen át 0,1 mólos nátrium-hidrogén-karbonáttal szemben (pH = 8,3) dializáljuk. Külön lombikban 25 ml AFFI-GEL 10-t (Bio-Rad) vízzel alaposan mossunk, üvegszűrő felhasználásával 0,1 mólos nátrium-hidrogén-karbonát-oldatban szuszpendálva (pH = 8,3) és a fenti anti-testtel összekeverjük. Az elegyet 4 órán át 4 °C-on a reakció lejátszatása céljából enyhén keverjük, majd 4 °C-on egy éjjelen át állni hagyjuk. Az AFFI-GEL 10-t 0,1 mólos nátrium-hidrogén-karbonát-oldattal (pH = 8,3) üvegszűrő alkalmazásával alaposan mossuk. A gélhez 25 ml, 0,1 mól etanol-amint és 0,15 mól nátrium-kloridot tartalmazó oldatot (pH = -8,0) adunk. Az elegyet 4 °C-on egy órán át rázatjuk a még visszamaradó reagálatlan aktív csoportot blokkolása céljából. A gélhez utaztat PBS-el (foszfáttal pufferolt nátrium-klorid-oldat; 0,01 mól/liter koncentrációjú foszfát nátrium-kloridban, 8,5 g/l, pH = 7,0) mossuk és 25 ml, 0,1% nátrium-azidot tartalmazó PBS-ben szuszpendáljuk. A szuszpenziót 4 °C-on tároljuk. A hozzáadott anti-test és a szűrletben levő anti-test mennyisége alapján azt találtuk, hogy az anti-test 2,35 mg/ml gél arányban kötődik a gélhez. Anti-test oszlopként az ily módon kapott reakciótermékkel töltött oszlopot alkalmazunk.

11. példa

Az rIFN- γ termeléshez E. coli RRI törzset alkalmazunk (pRK148cI_{ts}, pRC231/IFI-900) (e rekombináns organizmus szerkezetét a 99 084 sz. európai szabadalmi leírásban ismertették). A pRK248cI_{ts} és pRC231/IFI.900 plazmidok hőmérsékletre érzékeny Lambda-represszor és IFN- γ géneket tartalmaznak. Az rIFN- γ gének kifejezésre juttatása a P_l promoterral való szabályozás alatt történik.

A E. coli RRI törzs (pRK248cI_{ts}, pRC231/IFI-900) egy éjszakás tenyészetét LB

táptalajon 30 °C-on tenyésztjük. Az egyéjszakás tenyészet 1 literét kazamino-savakat tartalmazó minimális M-9 táptalajjal 10 literre hígítjuk. A „kazamino-savak” kazein hidrolízisével nyert, a mikrobiológiában felhasznált aminosav-keverékek. A „minimális M-9 táptalaj” ugyancsak a mikrobiológiában használatos táptalaj, amelynek összetétele a következő: dinátrium-hidrogén-foszfát 6 g/l; kálium-dihidrogén-foszfát 3 g/l; nátrium-klorid 0,5 g/l; ammónium-klorid 1 g/l; 1 mól/liter koncentrációjú magnézium-szulfát-oldat 2 ml/l; 1 mól/liter koncentrációjú kalcium-klorid-oldat 0,1 ml/l; 20%-os glükóz-oldat 0,1 ml/l; pH = 7,4. Logaritmus növekedés mellett a tenyészet hőmérsékletét 30 °C-ról 42 °C-ra növeljük, majd a tenyésztést 42 °C-on 2-3 órán át folytatjuk. A baktériumokat centrifugálással összegyűjtjük és a baktérium-tartalmú labdacokat felhasználásig -20 °C-on tároljuk. A frementáció és a feldolgozás minden műveletét a National Institutes of Health rekombináns DNS irányelveivel összhangban végezzük el.

A rIFN- γ szintetikus 131-146. C-terminális peptidjeinek monoklonális anti-testjeit a fenti módszerrel készítjük el. A rIFN- γ tisztítására Mo γ 2-11.1 monoklonális anti-testet alkalmazunk. A monoklonális anti-test-oszlopot a 10. példában leírtak szerint készítjük el.

A rIFN- γ ¹⁴C-jód-ecetsavval történő karboximetilezést 6 mól guanidin-hidroklorid jelenlétében, a (3) irodalmi helyen leírtak szerint hajtjuk végre. A reagens főlegét C-8 fordított fázisú oszlopon történő nagynyomású folyadékkromatográfiával távolítjuk el. A karboxipeptizázos bontást 0,2 mólos ammónium-karbonát-oldatban a (4) irodalmi helyen leírtak szerint végezzük el.

A rIFN- γ CNBr-el történő kezelését (mentionhoz viszonyítva 100-szoros moláris fölösleg) 70%-os hangyasavban az (5) irodalmi helyen leírtak szerint végezzük el. A CNBr peptideket C-18 fordított fázisú oszlopon nagynyomású folyadékkromatográfiával választjuk el. A peptid eluálását 0 és 70% közötti mennyiségű metil-cianidot tartalmazó

trifluor-ecetsav elegyekkel lineáris grádiens szerint végezzük el.

A fehérje vagy peptid mintákat lezárt, nitrogénnel öblített, evakuált csövekben, 4% tioglikolsavat tartalmazó állandó forrásban levő sósavban 20-24 órán át hidrolizáljuk. Az amino-analízist a (6) irodalmi helyen leírtak szerint fluor-eszcamin aminosav-analizátorban hajtjuk végre.

A karboximetilezett fehérjék szekvencia analizéséhez a (7) irodalmi helyen leírtak szerint ABI (Applied Biosystem Inc.) gázfázisú szekvenciátort (470A) alkalmazunk. A PTH-aminosavak mintáit a (8) irodalmi helyen leírtak szerint ultraszférikus ODS oszlopon fordított-fázisú nagynyomású folyadékkromatográfiával azonosítjuk.

Valamennyi tisztítási lépést 4 °C-os hőmérsékleten végezzük el. 25 g fagyasztott sejtet háromszoros mennyiségű (75 ml) 7 mólos guanidin-hidrokloridban szuszpendálunk (pH = 7). Az elegyet 1 órán át keverjük, majd 1 órán keresztül 30000 g sebességgel centrifugáljuk. A felül elhelyezkedő folyadékot tízszeres mennyiségű, Dulbecco-féle foszfáttal pufferolt konyhasó-oldattal (PBS) vagy 0,15 mólos nátrium-borát-pufferrel (pH = 9,5) hígítjuk, majd 30 percen keresztül 30000 g sebességgel centrifugáljuk. Eljárhatunk oly módon is, hogy 25 g fagyasztott sejtet másfélszeres térfogatú (37,5 ml) 0,15 mólos nátrium-borát-pufferben (pH = 9,5) szuszpendálunk és 1 órán át keverünk. Az elegyet 30-30 mp-ig 5 izben szonifikáljuk, majd 30000 g sebességgel 1 órán át centrifugáljuk. A guanidin-hidrokloridos extrakcióból vagy szonifikációból származó, felül elhelyezkedő folyadékokat forgó rázató gépen 25 ml kovasavval 1 órán át keverjük, majd PBS-el előmossuk. Az elegyet oszlopra visszük fel és az oszlopot összesen 20-30 oszloptérfogatnyi 1 mólos nátrium-klorid-oldattal mossuk. Az oszlopot 0,5 mól tetrametil-ammonium-kloridot tartalmazó 0,01 mólos nátrium-borát-pufferrel (pH = 8) eluáljuk. Az interferont kb. 200 ml oldószerrel eluáljuk és 4 részre osztjuk. Minden részletet PBS-el egyensúlyba hozott monoklonikus anti-test (γ 2-11.1) affinitás oszlopra viszünk fel, (4 ml ágytérfogat). Az oszlopot 10 oszloptérfogatnyi PBS-pufferrel mossuk, majd 1 mólos guanidin-hidrokloriddal vagy 50%-os etilén-glikollal (amely 1 mól nátrium-kloridot és 20 mmól nátrium-foszfát puffert /pH = 7,0/ tartalmaz) eluáljuk. Az interferont az első 20 ml-el eluáljuk.

Az SDS-PAGE elvégzése Laemmli módszerrel történik (9. irodalmi hely). A fehérjét fluoreszcamin analízissel határozzuk meg, referens standardként kristályos marhaszérum-albumint alkalmazunk. Az interferon aktivitást a 10. irodalmi helyen leírt módon, vesicularis stomatitis vírus és humán WISH sejtek felhasználásával, a citopatikus hatás inhibíciós assay segítségével határozzuk meg. Az összes interferon titert a részlegesen

tisztított humán immun interferon referencia standardhoz viszonyítva, referens egység/ml formájában fejezzük ki.

Az extrakciós tisztítási műveleteket a 6. táblázatban foglaljuk össze. Az össz-kitermelés 25-32% és a tisztítás mértéke 100-769-szoros, az átlagos fajlagos aktivitás 1×10^7 egység/mg. Az rIFN- γ össz-kitermelése a guanidines extrakció esetében 3-4-szer nagyobb. A tisztítási műveletek utolsó lépésének SDS-PAGE diagramját az 1. ábrán mutatjuk be. A guanidines extrakcióval tisztított termék kb. 18000 daltonnál (18K rIFN- γ) egyetlen sávot mutat, míg a szonifikációs eljárás esetében kb. 15000 daltonnál (15K rIFN- γ) egy főszáv és kb. 17000 daltonnál (1A ábra) egy mellékszáv jelentkezik. Nem-redukáló gélen a rIFN- γ dimerjei és oligomerjei is képződnek (1B ábra).

A 18K rIFN- γ homogén, és aminosav-összetétele a DNS szekvencia alapján várható összetételnek felel meg. A 15K és 18K rIFN- γ aminosav-összetételét a 7. táblázatban tüntetjük fel. Automata gázfázisú fehérje/peptid szekvencia meghatározó készülékben néhány száz pikomól redukált és karboximetilezett 15K és 18K fehérje Edman-bomlást szenved. A 15K és 18K fehérjék első 32 és 26 maradékának aminosav-N-terminális szekvenciái a DNS szekvencia alapján vártak felelnek meg (2. ábra). A szekvencia analízis első és harmadik ciklusában ^{14}C -karboximetilezett ciszteineket mutattunk be. N-terminális metionint nem mutattunk ki. A 18K és 15K rIFN- γ N-terminális szekvencia analízise azt mutatja, hogy mindkét fehérje esetében e tartományok szekvenciája a DNS szekvencia alapján várttal azonos. A fenti tartományban fellépő esetleges kiesések vagy változások meghatározása céljából a C-terminális peptideket is jellemezzük. A karboxipeptidáz A (CPA) által megbontott elegy aminosav analízise azt mutatja, hogy a 18K rIFN- γ -ból szerin és/vagy glutamin (C-terminális aminosavak) szabadulnak fel, ugyanakkor azonban azonos körülmények között a CPA a 15K rIFN- γ -t nem bontja. Minthogy a Ser-Gln képezi a rIFN- γ C-terminális szekvenciáját, a 18K species inaktív C-terminust tartalmaz, míg a 15K species esetében a C-terminális maradék (Lys) ettől eltérő és CPA nem bontja.

A DNS-szekvencia alapján várható C-terminális maradékok további bizonyítása céljából a C-terminális peptideket CNBr-es kezelés után analízisnek és szekvencia-meghatározásnak vetjük alá. A C-terminális peptideket C18 fordított-fázisú oszlopon nagynyomású folyadékkromatográfiával választjuk szét (3. ábra). A 15K rIFN- γ esetében a gradiens korai részéből eluálva erős peptid csúcsot (II. csúcs) nyerünk és ez a peptid a 18K rIFN- γ CNBr-el történő megbontása után kapott keverékben nincs jelen. A fenti peptid aminosav-analízis alapján homoszerint vagy homoszerin-laktont nem tartalmaz és

ezért a 15K fehérje C-terminális CNBr peptidjének tekintendő. A fenti fehérje aminosav-analízis alapján (8. táblázat) az IFN- γ 121-131 sz. aminosav-maradékának felel meg (arginin nem mutatható ki). A 11 aminosav szekvenciáját szekvencia-analízissel igazoljuk (2. ábra). A 18K rIFN- γ esetében az eluálás korai részében viszonylag széles csúcsot kapunk, amelyet sekély gradienssel két csúcsra választunk szét. Az aminosav analízis azt mutatja, hogy az első csúcs a 18K fehérje CNBr C-terminális peptidje (8. táblázat) és az

aminosav-összetétel a 138-146. aminosav-maradéknak felel meg. A 9 aminosav szekvenciáját szekvencia-meghatározással igazoljuk (2. ábra). A 15K fehérje C-terminális aminosava a meghatározás alapján lizin.

A fenti eredmények igazolják, hogy a 18K species az érintetlen rIFN- γ molekula, míg a 15K species a proteolitikus termék. A 131 sz. aminosav és a 132 sz. aminosav maradéka között peptid kötést (Lys-Arg) a 15K speciesen hasítjuk el.

6. táblázat

rIFN- γ tisztítása

Tisztítási lépés	Összfehérje mg	Teljes aktivitás egység	Fajlagos aktivitás egység/ml	Tisztítás -szoros-	Ki-termelés %
I. Guanidines extrakció					
Felülúszó	2.806	2.5×10^6	9×10^4	-	100
Kovasav	98	1.0×10^6	1×10^6	11	40
Monoklonális anti-test	8	0.8×10^6	1×10^7	110	32
II. Szonifikáció					
Felülúszó	6.136	8.0×10^7	1.3×10^4	-	100
Kovasav	87	4.5×10^7	5.2×10^6	400	56
Monoklonális anti-test	2	2.0×10^7	1.0×10^7	769	25

7. táblázat

A 15K és 18K rIFN- γ aminosav-összetétele (maradék számok)

	18K (1-146)	15K (1-131)
Asp	20.9 (20)	19.9 (20)
Thr	5.1 (5)	4.9 (5)
Ser	9.8 (11)	6.7 (9)
Glu	18.5 (18)	15.1 (16)
Pro	* (2)	* (2)
Gly	5.9 (5)	5.6 (4)
Ala	8.2 (8)	7.3 (7)
Cys	* (2)	* (2)
Val	9.1 (8)	9.1 (8)
Met	4.8 (4)	3.8 (3)
Ile	7.2 (7)	6.6 (7)
Leu	10.5 (10)	9.6 (9)
Tyr	5.5 (5)	4.8 (5)
Phe	10.3 (10)	8.2 (9)
His	1.8 (2)	2.5 (2)
Lys	19.9 (20)	16.9 (19)
Arg	8.6 (8)	5.6 (3)
Trp	* (1)	* (1)

A zárójelben levő számok a DNS szekvencia alapján várható maradékok számát jelzik.

* az értékeket nem határoztuk meg.

8. táblázat

A 15K és 18K CNBr C-terminális peptidjei

	15K	18K
Thr	0.9 (1)	
Ser	1.1 (1)	0.84 (1)
Glu	1.1 (1)	1.1 (1)
Pro	* (1)	
Gly	1.5 (1)	1.3 (1)
Ala	2.4 (3)	1.1 (1)
Leu	1.0 (1)	1.1 (1)
Phe		1.0 (1)
Lys	1.9 (2)	2.8 (3)
Helyzetek a szekvenciában	121-131	138-146

A zárójelben levő számok a DNS szekvencia várható maradékok számát jelentik.

* az értékeket nem határoztuk meg.

A leírásban szereplő irodalmi utalásokat az alábbiakban részletezzük:

1. Gray, P. W., et al., *Nature* 295, 503-508 (1982)
2. Stahelin, T., et al., *J. Biol. Chem.* 256, 9750-9754 (1981)
3. Allan, G., *Sequencing of Protein and Peptides*, pp. 30-31 (1981), North-Holland Publishing Co., Amsterdam, New York
4. Amber, R. P., *Methods in Enzymology* 11, 436-445 (1967)
5. Wolfe, R. A. and Stein, S., *Modern Methods in Pharmacology*, pp. 55-77 (1982, Alan R. Liss, Inc. New York, NY.)
6. Stein, S. and Brink, L. *Methods in Enzymology*, 79, 20-25 (1981)
7. Hewick, R. M., Hunkapillar, M. W., Hodde, L. E. and Dreyer, W. I. *J. Biol. Chem.* 256, 7990-7997 (1981)
8. Hawke, D., Yuan, P-M., and Shively, J. E. *Anal. Biochem.* 120, 302-311 (1982)
9. Laemmli, U. K., *Nature* 227, 680-685 (1970)
10. Rubinstein, S., Familletti, P. C. and Pestka, S., *J. Virol.* 37, 755-758 (1981).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás

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

Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys
25 Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys
Ser Val Glu Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val
Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg
Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser
Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile
30 His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg
Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala
Ser Gln szekvenciájú

intakt rekombináns humán immun interferon
35 extrakciójára a fenti fehérjét tartalmazó
transzformált mikroorganizmusokból, azzal
jellemmezve, hogy a transzformált mikroorga-
nizmust valamely proteáz inhibitorral extra-
háljuk.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal
40 jellemmezve, hogy proteáz-inhibitorként guanid-
in-hidrokloridot alkalmazunk.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal
jellemmezve, hogy a transzformált mikroorga-
45 nizmust a guanidin-hidroklorid oldatában
szuszpendáljuk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás, azzal
jellemmezve, hogy legalább 4 mól/liter kon-
50 centrációjú guanidin-hidroklorid-oldatot al-
kalmazunk.

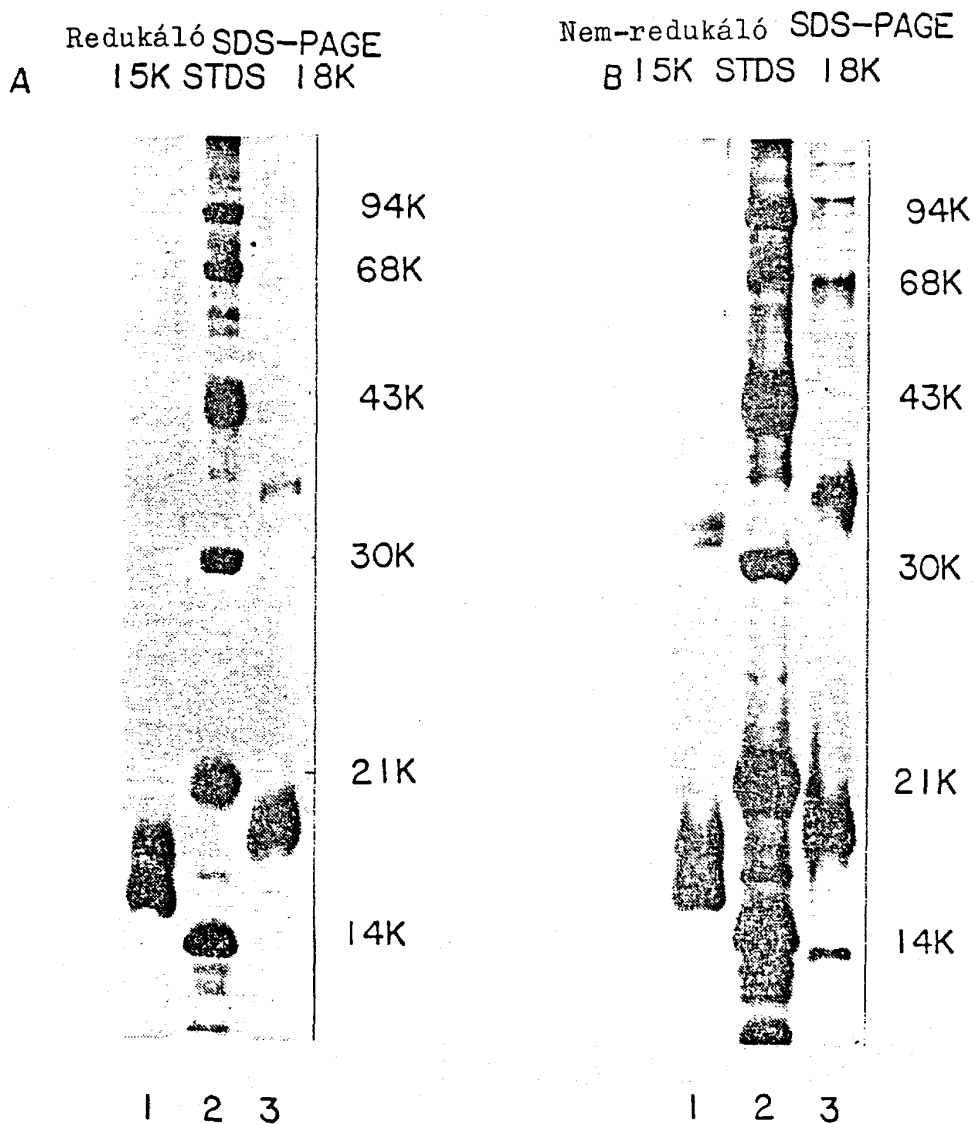
5. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljá-
rás, azzal jellemmezve, hogy a transzformált
mikroorganizmus preparátumot a proteáz in-
55 hibitorral történő kezelés után felülúszó
frakcióra és sejtmardvány frakcióra vá-
lasztjuk szét, és a felülúszó frakcióból
nyerjük ki a humán immun interferont.

3 rajz

A kiadásért felel a Közgazdasági és Jogi Könyvkiadó igazgatója

89.1253.66-4 Alföldi Nyomda Debrecen - Felelős vezető: Benkő István vezérigazgató

1. ábra



3. ábra

