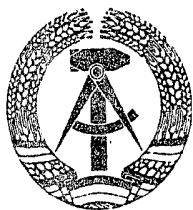


(19) DEUTSCHE DEMOKRATISCHE REPUBLIK

PATENTSCHRIFT



Ausschliessungspatent

Erteilt gemäss § 17 Absatz 1 Patentgesetz

ISSN 0433-6461

(11)

209 652

Int.Cl.³

3(51)

C 12 N 15/00

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) AP C 12 N/ 2494 141
(31) 190.799;291.892

(22) 25.09.81
(32) 25.09.80;11.08.81

(44) 16.05.84
(33) US;US

(71) siehe (73)
(72) CREA, ROBERTO;IT;NORMAN GOEDEL, DAVID VAN;US;
(73) GENENTECH, INC., SAN FRANCISCO, US

(54) **VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES REPLIKABLEN VEKTORS**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung eines replikablen Vektors, der in einem Mikroorganismus die Expression eines Polypeptids mit der Aminosäuresequenz eines reifen Human-Fibroblasten-Interferons bewirkt. Ziel der Erfindung ist es, den Herstellungsweg von Interferon zu vereinfachen und wesentlich größere Mengen davon bereitzustellen. Erfindungsaufgabe ist die Entwicklung eines Verfahrens zur Herstellung eines replikablen Vektors als Teilaspekt der rekombinanten DNS-Technologie bei der Fibroblasten-Interferon-Produktion. Erfindungsgemäss verbindet man eine, ein Polypeptid codierende erste DNS-Sequenz operabel mit einer zweiten DNS-Sequenz, die die für die Expression notwendigen Codons enthält. Bei dem Polypeptid handelt es sich um ein solches mit der Aminosäuresequenz eines reifen Human-Fibroblasten-Interferons ohne Präsequenz oder Teil einer solchen.

249414 1

Berlin, den 12.9.1983
61 982/12/38
Ausscheidung II aus
AP C 12 N/233 598
59 858/12/

Verfahren zur Herstellung eines replikablen Vektors

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft das Gebiet der rekombinanten DNS-Technologie, d. h. Verfahren, die auf diesem Gebiet eingesetzt werden.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung ein Herstellungsverfahren eines replikablen Vektors, der in einem Mikroorganismus die Expression eines Polypeptids mit der Aminosäuresequenz eines reifen Human-Fibroblasten-Interferons bewirkt.

Hintergrund der Erfindung

Human-Fibroblasten-Interferon (FIF) ist ein Protein, das antivirale sowie ein weites Spektrum anderer biologischer Aktivitäten aufweist (Übersicht siehe W. E. Stewart II, The Interferon System, Springer-Verlag, New York-Wien, 1979). Angeblich ist es bis zur Homogenität gereinigt worden. Es handelt sich um ein einzelnes Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 19000 bis 20000, mit einer spezifischen Aktivität von 2 bis 10×10^8 Einheiten/mg (E. Knight, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 520 - 523 [1976]; W. Berthold et al., J. Biol. Chem. 253, 5206 - 5212 [1978]). Die Sequenz der 13 NH₂-terminalen Aminosäuren des FIF wurde als Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser bestimmt (E. Knight et al., Science 207, 525 - 526 [1980]). Houghton et al. (Nucleic Acids Res. 8, 1913 - 1931 [1980]) haben synthetische

249414 1

-2-

12.9.1983

61 982/12/38

Deoxyoligonucleotide (vorausgesagt aus der vorstehend angegebenen Aminosäuresequenz) verwendet, um die Sequenz der 276 5'-terminalen Nucleotide von FIF-mRNS zu bestimmen. Taniguchi et al. (Nature 285, 547 - 549 [1980]; Gene 10, 11 - 15 [1980]) und Derynck et al. (Nature 285, 542-547 [1980]) waren kürzlich in der Lage, die Nucleotidsequenz klonierter cDNS-Kopien von FIF-mRNS in E. coli zu bestimmen und haben daraus die vollständige Aminosäuresequenz von Human-FIF einschließlich einer 21 Aminosäure umfassende Signalsequenz abgeleitet. Das reife Peptid umfaßt 166 Aminosäuren. Schließlich haben Taniguchi et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5230 - 5233 [1980]) ein Plasmid konstruiert, welches die Expression des Human-FIF-Gens in E. coli veranlaßt, so daß reifes FIF erhalten wird.

Durch rekombinante DNS-Technologie ist es inzwischen gelungen, eine große Anzahl wertvoller Polypeptide kontrolliert mikrobiell herzustellen. So existieren inzwischen bereits Bakterien, die durch diese Technologie so modifiziert wurden, daß sie die Herstellung von Polypeptiden wie Somatostatin, die A- und B-Ketten des Human-Insulins und Human-Wachstumshormon gestatten (Itakura et al., Science 198 1056 - 1063 [1977]); Goeddel et al., Nature 281, 544 - 548 [1979]). Kürzlich gelang durch die Anwendung der rekombinanten DNS-Technik die bakterielle Herstellung von Proinsulin, Thymosin α_1 und Leukozyten-Interferon.

Das Zugpferd der rekombinanten DNS-Technologie ist das Plasmid, eine nicht-chromosomale Schleife doppelsträngiger DNS, die in Bakterien und anderen Mikroben oft in vielen Kopien pro Zelle vorliegt. Die in der Plasmid-DNS enthaltene Information umfaßt diejenige zur Reproduktion des Plasmids in

249414 1

-3-

12.9.1983

61 982/12/38

Tochterzellen (d. h. ein "Replicon") und gewöhnlich ein oder mehrere Selektions-Charakteristika wie - im Fall von Bakterien - die Resistenz gegenüber Antibiotika, die es erlauben, Klone der Wirts-Zelle, die das interessierende Plasmid enthalten, zu erkennen und in einem ausgewählten Medium selektiv zu züchten. Die Nützlichkeit der Plasmide liegt in der Tatsache, daß sie spezifisch durch die eine oder andere Restriktions-Endonuclease (auch Restriktions-enzym genannt) gespalten werden können, wobei jede Endonuclease eine andere Stelle der Plasmid-DNS erkennt. Heterologe Gene oder Genfragmente können in das Plasmid an den Spaltstellen oder anschließend an die Spaltstellen rekonstruierte Enden eingefügt werden. Die DNS-Rekombination wird außerhalb der Zelle durchgeführt, aber das erhaltene rekombinante Plasmid wird durch einen Vorgang, der als Transformation bekannt ist, in die Zelle eingeführt, und große Mengen an heterologe Gene enthaltenden, rekombinierten Plasmiden können durch Kultivierung der transformierten Zellen erhalten werden. Ist das heterologe Gen in richtiger Weise (d. h. operabel) bezüglich derjenigen Teile des Plasmids eingefügt, die für die Transcription und Translation der kodierten DNS-Nachricht verantwortlich sind, dann kann das erhaltene rekombinierte Plasmid (Expressionsvektor, Vektor) zur Herstellung des Polypeptids verwendet werden, das durch das heterologe Gen kodiert wird. Dieser Prozeß wird als Expression bezeichnet.

Die Expression wird ausgelöst in der Promotor-Region, die durch RNS-Polymerase erkannt und gebunden wird. In einigen Fällen, wie z. B. beim Tryptophan- oder "Trp"-Promotor, der in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bevorzugt ist, werden Promotor-Regionen von sogenannten Operator-Regionen überlappt und bilden dann einen kombinierten Promotor-Opera-

249414 1 -4-

12.9.1983

61 982/12/38

tor. Operatoren sind DNS-Sequenzen, die von sogenannten Repressor-Proteinen erkannt werden, die wiederum die Frequenz des Transkriptionsbeginns an einem speziellen Promotor regulieren. Die Polymerase wandert an der DNS entlang und überschreibt die Information, die der kodierende Strang enthält, vom 5'- zum 3'-Ende in mRNA, die dann wiederum in das Polypeptid mit der durch die DNS-kodierten Aminosäuresequenz übersetzt wird. Jede Aminosäure eines Polypeptids wird innerhalb des sogenannten Strukturgens durch ein Nukleotid-Triplett oder Codon kodiert. Nach der Bindung an den Promotor transkribiert die RNA-Polymerase zunächst Nukleotide, die eine Ribosomen-Bindungsstelle kodieren, dann ein Translations-Startsignal (gewöhnlich ATG, das in der mRNA zu AUG wird) und schließlich die Nukleotid-Sequenzen des Strukturgens selbst. Am Ende des Strukturgens werden sogenannte Stopcodons transkribiert, nach denen die Polymerase noch weitere mRNA-Sequenzen bilden kann, die aber wegen des vorhandenen Stoppsignals von den Ribosomen nicht mehr übersetzt werden. Die Ribosomen lagern sich an die vorgesehene Bindungsstelle der mRNA an, in Bakterien gewöhnlich während diese entsteht, und stellen dann ihrerseits das kodierte Polypeptid her, beginnend am Translations-Startsignal und endend mit dem bereits erwähnten Stoppsignal. Das gewünschte Produkt wird hergestellt, wenn die Sequenzen, die die Ribosomen-Bindungsstelle kodieren, richtig in bezug auf das AUG-Startsignal und wenn alle übrigen Kodons mit dem Startsignal in Phase sind. Das gewünschte Polypeptid kann erhalten werden durch Lyse der Wirts-Zelle, Abtrennung von anderen Bakterienproteinen und Reinigung in üblicher Weise.

Während das aus Spender-Fibroblasten isolierte homogene Fibroblasten-Interferon ausreichte zur partiellen Charakte-

249414 1 -5-

12.9.1983

61 982/12/38

risierung und für limitierte klinische Studien, reicht diese Quelle bei weitem nicht aus für die Gewinnung derjenigen Mengen an Interferon, die für bereits klinische Prüfungen und die anschließende prophylaktische und/oder therapeutische Verwendung notwendig sein werden. Tatsächlich bediente man sich bei den bisherigen klinischen Untersuchungen zur Evaluation des Human-Fibroblasten-Interferons in Antitumor- und antiviralen Testen hauptsächlich rohen Materials (Reinheit $< 1\%$), und die langen Zeiten, die nötig sind, um genügende Mengen reinen Materials zu erhalten, haben zu einer starken Verzögerung von Untersuchungen in größerem Maßstab geführt.

Ziel der Erfindung

Es ist Ziel der Erfindung, den Herstellungsweg zu vereinfachen und wesentlich größere Mengen bereitzustellen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung eines replikablen Vektors zu entwickeln, der in einem Mikroorganismus die Expression eines Polypeptids mit der Aminosäuresequenz eines reifen Human-Fibroblasten-Interferons bewirkt.

Reinstes Fibroblasten-Interferon könnte trotz der Tatsache, daß es nicht glykosyliert ist, wie vielleicht das natürliche, zur klinischen Behandlung vieler viraler und neoplastischer Erkrankungen verwendet werden.

Ein Fibroblasten-Interferon-Gen wurde durch die folgenden Maßnahmen erhalten:

249414 1

-6-

12.9.1983

61 982/12/38

- 1) Aminosäurepartialsequenzen von homogenem Human-Fibroblasten-Interferon wurden verwendet, um synthetische DNS-Sonden zu konstruieren, deren Codons insgesamt alle möglichen Nucleotidkombinationen repräsentierten, durch die die Aminosäurepartialsequenzen kodiert werden.
- 2) Es wurden Bänke von Bakterienkolonien hergestellt, die komplementäre DNS (cDNS) aus induzierter mRNA enthielten. Die gemäß (1) erhaltenen Sonden wurden als Starter für die Synthese radiomarkierter einsträngiger cDNS verwendet, die wiederum als Hybridisierungssonden benutzt wurden. Die synthetischen Sonden hybridisierten mit induzierter mRNA als Matrize und wurden ferner mittels reverser Transkription dazu verwendet, induzierte, radio-markierte cDNS zu bilden. In dieser Weise erhaltene Klone der Koloniebanc, die mit radiomarkierter cDNS hybridisierten, wurden weiterhin untersucht auf das Vorliegen eines Interferon vollständig kodierenden Gens. Jedes so erhaltene, möglicherweise eine Teilsequenz des Interferons kodierende Genfragment wurde als Sonde für ein vollständiges Gen verwendet.
- 3) Das so erhaltene ungekürzte Gen wurde maßgeschneidert unter Verwendung synthetischer DNS, um jegliche Leader-Sequenz, die die mikrobielle Expression des reifen Polypeptids verhindern könnte, auszuschließen und um es in einem Vektor in die richtige Position bringen zu können bezüglich der Startsignale und der Ribosomenbindungsstelle eines mikrobiellen Promotors. Das exprimierte Interferon wurde so weit gereinigt, daß es charakterisiert und seine Aktivität bestimmt werden konnte.

249414 1 -7-

12.9.1983

61 982/12/38

Unter Anwendung der vorstehend kurz beschriebenen Methoden der rekombinanten DNS-Technologie konnte eine Reihe replizierbarer Plasmid-Vektoren hergestellt werden, die die Synthese eines reifen Polypeptids mit den Eigenschaften von authentischem Human-Fibroblasten-Interferon in einem transformierten Mikroorganismus mit hohen Ausbeuten veranlassen. Das erhaltene Polypeptid weist die Aminosäuresequenz des FIF auf und ist in in-vitro-Testen aktiv ungeachtet fehlender Glykosylierung, wie sie für Material, das aus natürlichen menschlichen Zellen gewonnen wurde, charakteristisch ist. Der Ausdruck "Expression von reifem Fibroblasten-Interferon" bezeichnet die mikrobielle (z. B. bakterielle) Herstellung eines Interferonmoleküls, das weder Glykosylgruppen noch eine Präsequenz enthält, die unmittelbar die mRNS-Translation des Human-Fibroblasten-Interferon-Genoms veranlassen. Reifes Fibroblasten-Interferon wird erfindungsgemäß unmittelbar von einem Translations-Startsignal (ATG) exprimiert, das gleichzeitig die erste Aminosäure des natürlichen Produkts kodiert. Die An- oder Abwesenheit von Methionin als erster Aminosäure im mikrobiell hergestellten Produkt ist kinetisch bedingt und hängt ab von den Fermentationsbedingungen und/oder der Höhe der Expression in dem transformierten Mikroorganismus. Reifes Fibroblasten-Interferon kann zusammen mit einem konjugierten Protein, das nicht ein üblicher Leader ist, exprimiert werden, wobei das Konjugat spezifisch intra- oder extrazellulär gespalten werden kann (vergleiche britische Patentanmeldung Nr. 2007676A). Schließlich kann das reife Interferon zusammen mit einem mikrobiellen "Signal-Peptid" hergestellt werden, das das Konjugat an die Zellwand transportiert, wo die Signalsequenz abgespalten und das reife Polypeptid sezerniert wird.

249414 1

-8-

12.9.1983

61 982/12/38

Die zum Inhalt dieser Beschreibung gehörenden Figuren 1 bis 5 werden an den geeigneten Textstellen genauer beschrieben. Fig. 6 stellt schematisch die Herstellung der Plasmide dar, die die direkte Expression von reifem Fibroblasten-Interferon kodieren. Die Restriktionsstellen und -fragmente sind angegeben ("Pst I", usw.). "Ap^R" und "Tc^R" bezeichnen diejenigen Orte des Plasmids, die für die Expression der Ampicillin- bzw. Tetracyclin-Resistenz verantwortlich sind. Die Abkürzung "p o" steht für "Promotor-Operator".

Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

A. Die verwendeten Mikroorganismen

Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Mikroorganismus ist *E. coli* K-12 Stamm 294 (end A, thi⁻, hsr⁻, hsm⁺_k), wie in der britischen Patentpublikation Nr. 255382 A beschrieben. Dieser Stamm wurde bei der American Type Culture Collection (ATCC Nr. 31446) hinterlegt. Die gesamte Arbeit wurde unter Beachtung der Richtlinien des National Institutes of Health durchgeführt.

Die vorliegende Erfindung, obgleich in ihrer am meisten bevorzugten Ausführungsform an *E. coli* K-12 Stamm 294 beschrieben, umfaßt auch die Verwendung anderer *E. coli*-Stämme wie *E. coli* B, *E. coli* x 1776 und *E. coli* W 3110 sowie andere Mikroorganismen, von denen viele bei einem offiziellen Depositorium (z. B. der American Type Culture Collection, ATCC) hinterlegt wurden und von dort (möglicherweise) erhältlich sind (vergleiche auch deutsche Offenlegungsschrift Nr. 2644432). Weitere Mikroorganismen, die erfindungsgemäß verwendet werden können, sind z. B. Bacilli, wie *Bacillus subtilis* und andere Enterobacteriaceae, unter denen vor allem

249414 1

-9-

12.9.1983

61 982/12/38

Salmonella typhimurium und Serratia marcescens zu nennen wären, die mit Hilfe von sich vermehrenden Plasmiden heterologe Gene zur Expression bringen können. Auch in Hefen, beispielsweise in Saccharomyces cerevisiae, können Interferongene zur Expression gebracht werden unter der Kontrolle eines Hefe-Promotors.

B. Allgemeine Methoden

Die Restriktionsenzyme wurden bei New England Biolabs gekauft und vorschriftsmäßig verwendet. Die Plasmid-DNS wurde nach einem Standard-Verfahren (D. B. Clewell, J. Bacteriol. 110, 667 - 676 [1972]) hergestellt und durch Säulenchromatographie an Biogel A-50 M gereinigt. Die DNS-Sequenzierung erfolgte nach der Methode von Maxam und Gilbert (Methods Enzymol. 65, 499 - 560 [1980]). Die durch Restriktion erhaltenen DNS-Fragmente wurden durch Elektrophorese aus Polyacrylamidgelen erhalten. Die Radiomarkierung der DNS-Fragmente zwecks Verwendung als Hybridisierungssonden erfolgte nach der Methode von Taylor et al. (Biochim. Biophys. Acta 442, 324 - 330 [1976]). Die in-situ-Koloniehybridisierung wurde nach der Methode von Grunstein und Hogness durchgeführt (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3961 - 3965 [1975]).

C. Synthese der Deoxyoligonucleotide

Die Deoxyoligonucleotide wurden synthetisiert nach der modifizierten Phosphotriester-Methode in Lösung (Crea et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5765 - 5769 [1978]) unter Verwendung von Trideoxynucleotiden als Bausteinen (Hirose et al., Tetrahedron Letters 28, 2449 - 2452 [1978]). Die

249414 1 -10-

12.9.1983

61 982/12/38

Materialien und allgemeinen Verfahren ähnelten den von Crea et al. beschriebenen (Nucleic Acids Res. 8, 2331 - 2348 [1980]). Die 6 Starter-Pools (Fig. 1), die jeweils 4 Dodecanucleotide enthielten, wurden durch separate Kopplung von 2 Hexamer-Pools (mit jeweils 2 unterschiedlichen 5'-terminalen Sequenzen) mit 3 verschiedenen Hexamer-Pools (mit jeweils 2 unterschiedlichen 3'-terminalen Sequenzen) erhalten.

D. Induktion der Fibroblasten

Human-Fibroblasten (Zelllinie GM-2504A) wurden gezüchtet, wie bereits von Pestka et al. beschrieben (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3898 - 3901 [1975]). Das Nährmedium (Eagle's Minimalmedium mit einem Gehalt von 10 % fötalem Kälberserum) wurde aus den Rollflaschen (850 cm³) entfernt und ersetzt durch 50 ml Nährmedium, enthaltend 50 µg/ml Poly(I) : Poly(C) und 10 µg/ml Cycloheximid. Dieses Induktionsmedium wurde nach 4 Stunden bei 37 °C entfernt und die Zell-Monoschichten wurden mit Phosphat-gepufferter Salzlösung gewaschen (PBS; 0,14M NaCl, 3mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 8mM Na₂HPO₄). Jede Flasche wurde bei 37 °C mit 10 ml einer Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco 610 - 5305) inkubiert, bis die Zellen sich ablösten. Dann wurde fötales Kälberserum bis zu einer Konzentration von 10 % zugesetzt. Das Zellmaterial wurde 15 Minuten bei 500 x g zentrifugiert, der Rückstand nochmals in PBS suspendiert und sedimentiert. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff gefroren. Pro Rollflasche wurden etwa 0,17 g Zellmaterial erhalten.

E. Herstellung und Assay von Interferon-mRNS

Poly(A)-enthaltende mRNS wurde nach der von Green et al.

249414 1

-11-

12.9.1983

61 982/12/38

(Arch. Biochem. Biophys. 172, 74 - 89 [1975]) beschriebenen Methode aus Humanfibroblasten durch Phenolextraktion und Oligo(dT)-Zellulose-Chromatographie erhalten. Die Poly(A)-enthaltende RNS wurde bezüglich Interferon-mRNS durch Zentrifugieren in einem linearen Saccharose-Gradienten (5 - 20 %, w/v) angereichert. Die RNS-Proben wurden während 2 Minuten auf 80 °C erhitzt, schnell abgekühlt, über die Gradienten gegeben und 20 Stunden bei 30000 U/min, bei 4 °C in einem Beckman SW-40 Rotor zentrifugiert. Die Fraktionen wurden gesammelt, mit Ethanol gefällt und in Wasser gelöst.

Ein-Mikrogramm-Proben von mRNS wurden, wie von Cavalieri et al. beschrieben (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3287 - 3291 [1977]), *Xenopus laevis*-Oocyten injiziert. Die Oocyten wurden 24 Stunden bei 21 °C inkubiert, homogenisiert und 5 Minuten mit 10000 x g zentrifugiert. Im Überstand wurde das Interferon nach dem CPE-Hemmtest (Stewart, The Interferon System, Springer-Verlag, New-York-Wien, 1979) bestimmt unter Verwendung von Sindbis-Virus und humanen diploiden Zellen (WISH). Für die 12 S-Fraktion der mRNS wurden Interferontiter von 1000 bis 6000 Einheiten/mg injizierter RNS festgestellt (NIH Referenzstandard).

F. Synthese und Clonierung von cDNS

Einsträngige cDNS wurde hergestellt in 100-ml-Reaktionen, aus 5 µg der 12 S mRNS-Fraktion, 20 mM Tris-HCl (pH 8,3), 20 mM KCl, 8 mM MgCl₂, 30 mM β-Mercaptoethanol, 100 µCi (α-³²P)dCTP und 1 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP. Der Starter war das synthetische HindIII-Decamer dCCAAGCTTGG (Scheller et al., Science 196, 177 - 180 [1977]), das auf der 3'-terminalen Seite um etwa 20 bis 30 Deoxythymidinreste unter

249414 1

-12-

12.9.1983

61 982/12/38

Verwendung der terminalen Deoxynucleotidyl-Transferase (Chang et al., Nature 275, 617 - 624 [1978]) verlängert worden war. 100 Einheiten reverser Transkriptase wurden zugesetzt, und das Reaktionsgemisch wurde 30 Minuten lang bei 42 °C inkubiert. Die Synthese des zweiten Stranges der DNS wurde wie von Goeddel et al. bereits beschrieben (Nature 281, 544 - 548 [1979]) aufgeführt. Die doppelsträngige cDNS wurde mit 1200 Einheiten S1-Nuklease während 2 Stunden bei 37 °C in 25 mM Natriumacetat (pH 4,5), 1 mM ZnCl₂ und 0,3 M NaCl behandelt. Nach Phenolextraktion wurde das Gemisch elektrophoretisch an einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Durch Elektroelution wurden etwa 0,5 µg cDNS von 550 - 1500 Basenpaaren (bp) erhalten. Ein aliquoter Teil (20 ng) wurde mit Deoxy(C)-Resten verlängert unter Verwendung terminaler Deoxynucleotidyl-Transferase (Chang et al., supra) und mit 100 ng des Plasmids pBR 322, welche mit Deoxyguanosinresten an der PstI-Spaltstelle (Chang et al., supra) verlängert worden war, verbunden. Das Gemisch wurde zur Transformation von E. coli K-12 Stamm 294 nach einem publizierten Verfahren (Hershfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3455 - 3459 [1974]) verwendet

G. Herstellung von induzierten und nicht induzierten ³²P-cDNS-Sonden

5 µg 12 S-mRNS wurden mit entweder 2 µg Oligo(dT)₁₂₋₁₈ oder je 5 µg der synthetischen Starter-Pools (Fig. 1) in 60 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8) und 1 mM EDTA kombiniert. Die Gemische wurden 3 Minuten gekocht, auf Eis gegeben und mit 60 µl 40 mM Tris-HCl (pH 8,3), 40 mM KCl, 16 mM MgCl₂, 50 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM dATP, dGTP, dTTP und 5 x 10⁻⁷ M (α-³²P)dCTP (2000 - 3000 Ci/mM) bei 0 °C versetzt. Nach Zusatz von 100 Einheiten reverser Transkriptase wurde 30

249414 1

-13-

12.9.1983

61 982/12/38

Minuten lang bei 42 °C inkubiert und durch Passage über eine 10-ml-Sephadex-G-50-Säule gereinigt. Die Produkte wurden mit 0,3 N NaOH während 30 Minuten bei 70 °C behandelt, neutralisiert und mit Ethanol gefällt.

Die ^{32}P -cDNSs wurden mit 100 µg Poly(A)-mRNS aus nicht-induzierten Fibroblasten in 50 µl 0,4 M Natriumphosphat (pH 6,8) und 0,1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt. Die Gemische wurden 5 Minuten auf 98 °C erhitzt und 15 Stunden bei 45 °C getempert. Durch Chromatographie an Hydroxyapatit, wie von Galau et al. beschrieben (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1020 - 1023 [1977]), wurden die DNS-RNS-Hybride (enthaltend nichtinduzierte cDNS-Sequenzen) von einsträngiger DNS (induzierten cDNS-Sequenzen) getrennt. Die DNS-RNS-Hybride wurden mit Alkali zwecks Entfernung von RNS behandelt.

H. Screening rekombinanter Plasmide mit ^{32}P -cDNS-Sonden

Plasmid-DNS-Proben von etwa 1 µg wurden aus individuellen Transformanten nach einem bekannten Verfahren (Birnboim et al., Nucleic Acids Res. 7, 1513 - 1523 [1979]) hergestellt. Die DNS-Proben wurden durch Behandlung mit EcoRI linearisiert, in Alkali denaturiert und jeweils auf 3 Nitrocellulosefilter nach der Tüpfelshybridisationsmethode (Kafatos et al., Nucleic Acids Res. 7, 1541 - 1552 [1979]) gebracht. Die Filter wurden mit den ^{32}P -cDNS-Sonden während 16 Stunden bei 42 °C in 50 % Formamid, 10 x Denhardt's Lösung (Biochem. Biophys. Res. Comm. 23, 641 - 646 [1966]), 6 x SSC, 40 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 mM EDTA und 40 µg/ml Hefe-RNS hybridisiert. (SSC enthält 0,15 M NaCl und 0,015 M Natriumcitrat, pH 7,0.) Die Filter wurden gewaschen mit 0,1 x SSC sowie 2 x 30 Minuten

249414 1 -14-

12.9.1983
61 982/12/38

lang bei 42 °C mit 0,1 % SDS, getrocknet und der Autoradiographie unterworfen.

I. Konstruktion von Plasmiden für direkte Expression von FIF

Die synthetischen Starter I (dATGAGCTACAAC) und II (dCATGAGCTACAAC) wurden nach der von Goeddel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 106 - 110 [1979], beschriebenen Methode phosphoryliert unter Verwendung von T4-Polynucleotidkinase und (γ -³²P)ATP bis zu einer spezifischen Aktivität von 700 Ci/mM. Die Starterreparatur wurde folgendermaßen durchgeführt: 250 pM der ³²P-Starter wurden vereinigt mit 8 µg (10 pM) eines 1200 Basenpaare langen HhaI-Restriktionsfragments, das die FIF-cDNS-Sequenz enthielt. Das Gemisch wurde mit Ethanol präzipitiert, in 50 µl Wasser resuspendiert, 3 Minuten gekocht, in Trockeneis-Ethanol gegeben und mit 50 µl einer Lösung von 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 14 mM MgCl₂, 120 mM NaCl, 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP bei 0 °C vermischt. Nach Zusatz von 10 Einheiten DNS-Polymerase I Klenowfragment wurde 4 1/2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Extraktion mit Phenol/CHCl₃ und Restriktion mit PstI wurde das gewünschte Produkt an einer 6%igen Polyacrylamidgelsäule gereinigt. Die anschließenden Verknüpfungen erfolgten bei Raumtemperatur (kohäsive Enden) oder bei 4 °C (stumpfe Enden) unter den von Goeddel et al., supra, angegebenen Bedingungen.

J. Assay für Interferonexpression in E. coli

Bakterienextrakte für den Interferon-Assay wurden folgendermaßen hergestellt: 1 ml Kulturen wurden über Nacht in LB (Luria-Bertani) Medium, enthaltend 5 µg/ml Tetracyclin, gezüchtet und auf 25 ml mit M9-Medium, das durch 0,2 % Glukose,

249414 1 -15-

12.9.1983

61 982/12/38

0,5 % Casaminosäuren und 5 µg/ml Tetracyclin ergänzt war, verdünnt. 10-ml-Proben wurden zentrifugiert, wenn die Absorption bei 550 nm (A_{550}) den Wert 1,0 erreichte. Die Zellkuchen wurden schnell in Trockeneis-Ethanol gefroren, und geklärte Lysate wurden, wie von Clewell (supra) beschrieben, hergestellt. Die Interferonaktivität in den Überständen wurde durch Vergleich mit NIH-FIF-Standard nach dem CPE-Hemmtest bestimmt. Es wurden 2 verschiedene Tests verwendet: (a) WISH-Zellen (humane Amnionzellen) wurden auf Mikrotiterplatten verteilt. Nach 16 bis 20 Stunden wurden die Proben zugesetzt und seriell zweifach verdünnt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 3 Stunden wurde Sidbis-Virus zugesetzt. Die Platten wurden nach 20 bis 24 Stunden mit Kristallviolett angefärbt. (b) MDBK-Zellen (aus Rinder-nieren) wurden ausgesät unter gleichzeitiger zweifacher Verdünnung der Proben. Nach einer Inkubationszeit von 2 bis 3 Stunden wurden vesikuläre Stomatitisviren zugesetzt, und nach weiteren 16 bis 18 Stunden wurden die Platten mit Kristallviolett angefärbt. Um die Stabilität bei pH 2 zu testen, wurden die Bakterienextrakte und Standarde in Minimal-medium auf eine Konzentration von 1000 Einheiten/ml verdünnt. Aliquote Teile von 1ml wurden mit 1 N HCl auf pH 2 gebracht, 16 Stunden bei 4 °C inkubiert und durch Zusatz von NaOH neutralisiert. Die Interferonaktivität wurde nach dem CPE-Hemmtest unter Verwendung menschlicher Amnionzellen bestimmt. Um antigenische Identität herzustellen, wurden aliquote Teile (25 µl) der 1000 Einheiten/ml enthaltenden Interferon-Proben (unbehandelt) 60 Minuten lang bei 37 °C mit 25 µl Kaninchen-Anti-Human-Leukozyten-Interferon inkubiert, 5 Minuten mit 12000 x g zentrifugiert, und der Überstand wurde getestet. FIF- und LIF-Standarde wurden vom NIH erhalten. Kaninchen-Anti-Human-Leukozyten-Interferon wurde vom

249414 1

-16-

12.9.1983

61 982/12/38

National Institut of Allergy and Infectious Diseases erhalten.

K. Synthese von Starterpools, die komplementär sind zu FIF-mRNS

Von der bekannten aminoterminalen Aminosäuresequenz des Human-Fibroblasten-Interferons wurden die 24 möglichen mRNS-Sequenzen, die für die Kodierung der ersten 4 Aminosäuren in Frage kommen, abgeleitet. Die theoretisch möglichen 24 komplementären Deoxyoligonucleotide wurden in 6 Pools zu je 4 Dodecameren synthetisiert (Fig. 1). Die Synthese erfolgte nach der modifizierten Phosphotriester-Methode in Lösung und an Festphasen (Crea et al., supra). Die grundlegende Strategie beruhte auf der Umsetzung zweier 3'-geschützter Trimerer mit einem Überschuß eines einzelnen 5'-geschützten Trimeren zu einem Pool von 2 Hexameren, die beide gleich stark vertreten waren. Die Kupplung von 2 Pools, die jeweils 2 Hexamere enthielten, lieferte dann einen Pool mit 4 Dodecameren.

L. Identifizierung von FIF-cDNS-Klonen

Unter Verwendung von 12S-mRNS aus induzierten Human-Fibroblasten (1000 Einheiten Interferon-Aktivität/ μ g im Oocyten-test) wurde doppelsträngige cDNS hergestellt und in das Plasmid pBR 322 an der PstI-Restriktionsstelle nach der Standard dG : dC-Tailing-Methode, wie von Chang et al. (supra) beschrieben, eingefügt. Eine FIF-cDNS-Bibliothek aus 30000 Ampicillin-empfindlichen, Tetracyclin-resistenten Transformanten von E. coli K-12 Stamm 294 wurde aus 20 ng cDNS, enthaltend 550-1300 Basenpaare, angelegt. Aus 600 der Transformanten wurde Plasmid-DNS hergestellt und auf 3 Sätze

249414 1 -17-

12.9.1983

61 982/12/38

von Nitrocellulosefiltern, wie oben beschrieben, gebracht.

Die Methode zur Identifizierung hybrider Plasmide, die FIF-cDNS-Sequenzen enthielten, ähnelte der, die angewandt wurde zur Identifizierung entsprechender hybrider Plasmide mit LIF-cDNS Sequenzen (Goeddel et al., Nature 287, 411 - 416 [1980]). Radiomarkierte cDNS-Hybridisierungssonden wurden hergestellt unter Verwendung von entweder den 24 synthetischen Dodecameren oder von Oligo (dT)₁₂₋₁₈ als Starter und 12S-RNS aus induzierten Fibroblasten (5000 Einheiten/ μ g im Oocytentest) als Matrize. Die erhaltenen ³²P-cDNSs (spezifische Aktivität $> 5 \times 10^8$ cpm/ μ g) wurden mit einem großen Überschuß an mRNS, aus nicht induzierten Human-Fibroblasten isoliert, hybridisiert, und die mRNS-cDNS-Hybride wurden von nicht umgesetzter cDNS mittels Chromatographie an Hydroxyapatit (Galau et al., *supta*) abgetrennt. Die einsträngigen cDNS-Fraktionen sollten angereichert sein mit Sequenzen, die in induzierten Fibroblasten vorhanden, in nicht-induzierten Zellen aber abwesend sind, und die mRNS-cDNS Hybride sollten Sequenzen darstellen, die sowohl in induzierten wie nicht-induzierten Zellen vorkommen. Etwa 4×10^6 cpm einsträngige cDNS (Hybridisierungssonde A) und 8×10^6 cpm cDNS-mRNS-Hybride wurden unter Verwendung der mit Oligo (dT)₁₂₋₁₈ gestarteten cDNS erhalten, während von der mit den synthetischen Dodecamerpools 1-6 gestarteten cDNS $1,5 \times 10^6$ cpm einsträngige cDNS (Hybridisierungssonde B) und $1,5 \times 10^6$ cpm Hybride erhalten wurden. Die cDNS-mRNS-Hybride aus beiden Fraktionierungen wurden vereinigt, die RNS durch Behandlung mit Alkali hydrolysiert, und die ³²P-cDNS wurde als Hybridisierungssonde C verwendet. Viele der 600 Plasmidproben hybridisierten sowohl mit der Sonde A wie mit der Sonde C, was darauf hinwies, daß die Hybridisierungs-

249414 1 -18-

12.9.1983

61 982/12/38

reaktionen zwischen nicht induzierter mRNS und ^{32}P -cDNS (vor der Hydroxyapatitfraktionierung) nicht vollständig verlaufen waren. Nur 1 der 600 Plasmide (pF526) hybridisierte stark mit der speziell gestarteten, induzierten cDNS-Sonde B (Fig. 2). Plasmid pF526 hybridisierte auch mit der Oligo (dT)₁₂₋₁₈ gestarteten, induzierten cDNS-Sonde A und lieferte keine nachweisbare Hybridisierung mit der kombinierten nicht-induzierten Sonde C.

PstI-Behandlung mit pF526 zeigte, daß der klonierte cDNS-Abschnitt etwa 550 Basenpaare lang war, wahrscheinlich zu kurz, um den gesamten kodierenden Bereich für Fibroblasten-Interferon zu enthalten. Daher wurde eine ^{32}P -markierte DNS Sonde aus diesem PstI-Fragment hergestellt mittels DNS-Starter aus Kälberthymus (Taylor et al., supra). Diese Sonde wurde gebraucht, um 2000 einzelne Kolonien einer neu hergestellten Fibroblasten-cDNS-Bibliothek zu screenen. Die neue cDNS-Bibliothek wurde unter Verwendung von 12S-mRNS aus induzierten Fibroblasten mit einem Titer von 6000 Einheiten/ml im Oocytentest hergestellt. 16 Klone hybridisierten mit der Sonde. Die aus der Mehrzahl dieser Klone gewonnenen Plasmide lieferten bei Spaltung mit PstI 2 Fragmente, d. h., sie besaßen eine interne PstI-Spaltstelle. Klon pFIF3 enthielt den längsten cDNS-Abschnitt von etwa 800 Basenpaaren. Die DNS-Sequenz dieses Abschnitts wurde nach der Maxam-Gilbert-Methode (supra) bestimmt und ist in Fig. 3 gezeigt. Die Aminosäuresequenz des Human-Fibroblasten-Interferons, die aus der Nucleotidsequenz vorhergesagt wurde, ist mit der kürzlich von Taniguchi et al. (Gene 10, 11 - 15 [1980]) sowie von Derynck et al. (supra) beschriebenen identisch. Es wird zunächst eine Präsequenz oder ein Signalpeptid von 21 Aminosäuren kodiert, dann eine Aminosäuresequenz von

249414 1 -19-

12.9.1983

61 982/12/38

166 Aminosäuren, die das reife Interferon darstellen. Schließlich folgen 196 nicht übersetzte Nucleotide und ein Poly(A)-Schwanz. Die 20 aminoterminalen Aminosäuren des reifen FIF sind direkt bestimmt worden durch Sequenzierung und stimmen überein mit der aus der DNS-Sequenz vorhergesagten Sequenz.

M. Direkte Expression von Fibroblasten-Interferon

Um eine möglichst hohe Expression von reifem Fibroblasten-Interferon in *E. coli* zu erhalten, sollte der Start der Proteinsynthese am ATG-Codon des reifen Polypeptids (Aminosäure 1) und nicht am ATG-Codon des Signalpeptids (Aminosäure S1) stattfinden (Fig. 3).

Wie die das Signalpeptid kodierende Region aus dem Plasmid pFIF3 entfernt wurde, ist in Fig. 4 dargestellt. Ein DNS-Fragment aus 1200 Basenpaaren, das den gesamten, FIF kodierenden cDNS Abschnitt enthielt, wurde nach Behandlung von pFIF3 mit HhaI an einem Polyacrylamidgel isoliert. Zwei synthetische Deoxyoligonucleotidstarter, dATGAGCTACAAC(I) und dCATGAGCTACAAC(II) wurden hergestellt. Beide Starter enthalten die die ersten 4-Aminosäure des reifen Fibroblasten-Interferons kodierenden Sequenzen, und Starter II besitzt zusätzlich ein C am 5'-Ende. Starterreparatur und anschließende Verknüpfungen wurden für jeden der beiden Starter I und II getrennt durchgeführt und lieferten nahezu identische Resultate. Es werden daher hier nur die Reaktionen mit dem Starter I im Detail beschrieben. Die Starter wurden 5'-radiomarkiert unter Verwendung von (γ - 32 P) ATP und T4 Polynucleotidkinase und mit dem 1200 Basenpaare enthaltenden HhaI-DNS-Fragment kombiniert. Das Gemisch wurde durch Erhitzen denaturiert. Nach Hybridisierung des Starters an das

249414 1

-20-

12.9.1983

61 982/12/38

denaturierte HhaI-DNS-Fragment, wurde die Reparatur des oberen (+)-Stranges mit *E. coli*-DNS-Polymerase I Klenow-Fragment (Klenow et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 168 - 175 [1969]) katalysiert (Fig. 4). Gleichzeitig wird durch die 3' → 5'-Exonucleaseaktivität des Klenow-Fragments das in 3'-Richtung vorragende Ende des unteren (-)-Stranges entfernt unter Schaffung eines glatten Endes. Die Analyse des Reaktionsgemischs durch Polyacrylamidgелеlektrophorese zeigte, daß die Reparatur nicht vollständig war, sondern an verschiedenen bestimmten Stellen aufgehört hatte. Daher wurde das gesamte Reaktionsgemisch mit PstI behandelt, und das gewünschte 141 Basenpaare-enthaltendes Fragment (180000 Cerenko cpm; ca. 0,3 pM) wurde durch Polyacrylamidgелеlektrophorese gereinigt (Fig. 5). Die Bindung dieses Fragments an 1 µg (ca. 4 pM) des 363 Basenpaare-enthaltenden PstI-BglIII-Fragments, das auch pFIF3 isoliert wurde, mit anschließender BglIII-Behandlung, lieferte etwa 30 ng (ca. 0,1 pM, 50.000 Cerenkow cpm) des 504 Basenpaare-enthaltenden DNS-Fragments, das die gesamte reife Fibroblasten-Interferon kodierende Sequenz enthielt. Dieselben Reaktionen mit dem Starter II lieferten etwa 50 ng (ca. 0,15 pM, 83.000 Cerenkow cpm) des 505 Basenpaare-enthaltenden Produkts.

Die Konstruktion von Plasmiden, die die Synthese von Human-Fibroblasten-Interferonen lenken, ist in Fig. 6 dargestellt. Es wurden verschiedene Plasmide konstruiert, die die FIF-Synthese unter die Kontrolle von *E. coli* Lac- oder Trp-Promotor-Operatorsystemen brachte. Diese beiden Systeme haben sich bereits als geeignet für die direkte Expression von Eukaryoten-Genen in *E. coli* erwiesen: humanes Wachstumshormon wurde unter Verwendung des Lac-Systems (Goeddel et al.,

249414 1

-21-

12.9.1983

61 982/12/38

Nature 281, 544 - 548 [1979] synthetisiert, während Human-Leukozyten-Interferon in hohen Ausbeuten unter Verwendung des Trp-Systems erhalten wurde (Goeddel et al., Nature 287, 411 [1980]).

pBRH-trp wurde mit EcoRI behandelt, und das erhaltene Fragment wurde durch PAGE und Elektroelution isoliert. EcoRI-behandeltes Plasmid pSom11 (Itakura et al., Science 198, 1056 - 1063 [1977]; brit. Patentpublikation Nr. 2007676 A) wurde mit dem obigen Fragment kombiniert. Das Gemisch wurde mit T₄ DNS-Ligase behandelt und die erhaltene DNS zur Transformation von E. coli K-12 Stamm 294 in der bereits beschriebenen Weise verwendet. Die transformierten Bakterien wurden auf Grund ihrer Ampicillinresistenz selektioniert und nach der Koloniehybridisationsmethode von Grunstein et al. (supra) getestet, wobei das obige, aus pBRHtrp isolierte Fragment, das den Trp-Promotor-Operator enthielt und mit P³² radioaktiv markiert war, als Sonde verwendet wurde. Die Plasmid-DNS verschiedener, im Koloniehybridisationstest positiver Kolonien wurde isoliert, und die Orientierung der eingefügten Fragmente wurde durch Restriktionsanalyse mit den Enzymen BglII und BamHI bestimmt. E. coli 294 mit dem Plasmid pSOM7 Δ 2, das das Trp-Promotor-Operator-Fragment in der gewünschten Orientierung enthielt, wurde in LB-Medium, enthaltend 10 μ g/ml Ampicillin, gezüchtet. Man ließ die Zellen bis zu einer optischen Dichte von 1 (bei 550 nm) wachsen, zentrifugierte und suspendierte in M9-Medium bei 10facher Verdünnung. Die Zellen wurden nochmals 2 bis 3 Stunden zu einer optischen Dichte 1 wachsen gelassen, dann lysiert und das gesamte Zellprotein wurde durch SDS-Harnstoff (15 %) PAGE (Maizel et al., Methods Virol. 5, 180 - 246 [1971]) analysiert.

249414 1

-22-

12.9.1983

61 982/12/38

Das Plasmid pBR 322 wurde mit HindIII behandelt, und die vorstehenden HindIII-Enden wurden mit S1-Nuclease entfernt. Für letztere Reaktion wurden 10 µg HindIII-gespaltene pBR322 in 30 µl S1-Puffer (0,3 M NaCl, 1 mM ZnCl₂, 25 mM Natriumacetat, pH 4,5) mit 300 Einheiten S1-Nuclease 30 Minuten lang bei 15 °C behandelt. Die Reaktion wurde beendet durch Zusatz von 1 µl 30 x S1-Nuclease-Stopplösung (0,8 M Trisbase, 50 mM EDTA). Das Gemisch wurde mit Phenol und anschließend mit Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und schließlich mit EcoRI, wie bereits beschrieben, behandelt. Nach PAGE und Elektroelution wurde das große Fragment (1) erhalten, das ein EcoRI kohäsives Ende und ein stumpfes Ende, dessen kodierender Strang mit Thymidin beginnt, besitzt.

Das Plasmid pSom7 Δ 2 wurde mit BglII behandelt, und die resultierenden kohäsiven Enden wurden mittels Klenow-Polymerase I unter Verwendung aller 4 Deoxynucleotidtriphosphate doppelsträngig gemacht. Spaltung mit EcoRI sowie PAGE und Elektroelution lieferten ein kurzes lineares DNS-Fragment (2), das den Tryptophan-Promotor-Operator enthielt sowie Codons der LE' "proximalen" Sequenz stromaufwärts von der BglII-Spaltstelle ("Le' (p)"). Dieses Fragment besaß ein kohäsives EcoRI-Ende und ein stumpfes Ende, das von der Auffüllung der BglII-Spaltstelle herrührt. Aus den beiden Fragmenten (1) und (2) wurde mit Hilfe von T₄-DNS-Ligase das Plasmid pHKY 10 gebildet, mit dem kompetente E. coli Stamm 294-Zellen transformiert wurden.

Das Plasmid pGMI trägt das E. coli-Tryptophan-Operon mit der Deletion Δ LE1413 (Miozzari et al., J. Bacteriology 133, 1457 - 1466 [1978]) und exprimiert daher ein Fusionsprotein mit den ersten 6 Aminosäuren des Trp-Leaders und etwa dem letzten Drittel des Trp E-Polypeptids (im folgenden LE' ge-

249414 1 -23-

12.9.1983
61 982/12/38

nannt) sowie dem vollständigen Trp D-Polypeptid, und zwar unter der Kontrolle des Trp-Promotor-Operator-Systems. Das Plasmid (20,ug) wurde mit dem Restriktionsenzym PvuII an 5 Stellen gespalten. Die Genfragmente wurden dann mit EcoRI-Verbindungssequenzen (bestehend aus einer selbst-komplementären Polynukleotidsequenz pCATGAATTCATG) kombiniert, um eine EcoRI-Spaltstelle für das spätere Klonieren in ein Plasmid mit einer solchen EcoRI-Spaltstelle zu schaffen. Die 20,ug der aus pGM1 erhaltenen DNS-Fragmente wurden mit 10 Einheiten T_4 DNS-Ligase in Gegenwart von 200 pMol des 5'-phosphorylierten synthetischen Oligonucleotids pCATGAATTCATG in 20,ul T_4 DNS-Ligase-Puffer (20 nMol Tris, pH 7,6, 0,5 mMol ATP, 10 mMol $MgCl_2$, 5 mMol Dithiothreitol) bei 4 °C über Nacht behandelt. Die Lösung wurde dann 10 Minuten auf 70 °C erwärmt. Die Verbindungssequenzen wurden mit EcoRI gespalten, und die Fragmente, die nun EcoRI-Enden enthielten, wurden mittels 5 % Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Die drei größten Fragmente wurden aus dem Gel isoliert. Dazu wurde zunächst mit Ethidiumbromid angefärbt, die lokalisierten Fragmente wurden über UV-Licht ausgemacht und die betreffenden Regionen aus dem Gel herausgeschnitten. Jedes Gelfragment wurde mit 300 Mikroliter 0,1 x TBE in eine Dialysetasche gebracht und während 1 Stunde in 0,1 x TBE-Puffer der Elektrophorese bei 100 Volt ausgesetzt (TBE-Puffer enthält: 10,8 g Tris-Base, 5,5 g Borsäure, 0,09 g Na_2EDTA in 1 Liter H_2O). Die wässrige Lösung wurde gesammelt, mit Phenol extrahiert, mit Chloroform extrahiert und 0,2 M an Natriumchlorid gemacht. Die DNS wurde nach Ethanolfällung in wässriger Lösung erhalten. Das den trp-Promotor-Operator enthaltende Gen mit EcoRI kohäsiven Enden wurde nach der im folgenden beschriebenen Methode identifiziert, die darin besteht, daß man Fragmente in ein

249414 1

-24-

12.9.1983

61 982/12/38

Tetracyclin-empfindliches Plasmid einbaut, die durch Einbau eines Promotor-Operators Tetracyclin-resistent werden.

Das Plasmid pBRH1 (Rodriguez et al., Nucleic Acids Res. 6, 3267 - 3287 [1979]) exprimiert Ampicillinresistenz und enthält das Gen für Tetracyclinresistenz, aber, weil kein zugehöriger Promotor existiert, exprimiert diese Resistenz nicht. Das Plasmid ist daher Tetracyclinempfindlich. Durch Einfügung eines Promotor-Operator-Systems an der EcoRI-Spaltstelle kann das Plasmid Tetracyclin-resistent gemacht werden.

pBRH1 wurde mit EcoRI behandelt und das Enzym durch Phenol-extraktion und Chloroformextraktion entfernt. Das nach Ethanolpräzipitation in Wasser erhaltene DNS-Molekül wurde in getrennten Reaktionsgemischen kombiniert mit jedem der drei DNS-Fragmente, die oben erhalten wurden und mit T₄ DNS-Ligase, wie bereits beschrieben, verbunden. Die DNS des Reaktionsgemischs wurde zur Transformation kompetenter E. coli K-12 Stamm 294-Organismen nach Standardmethoden (Hersfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3455 - 3459 [1974]) verwendet. Die Bakterien wurden auf LB (Luria-Bertani) - Platten gebracht, die 20 µg/ml Ampicillin und 5 µg/ml Tetracyclin enthielten. Es wurden verschiedene Tetracyclin-resistente Kolonien ausgewählt, die Plasmid-DNS isoliert und das Vorhandensein des gewünschten Fragmentes durch Restriktionsenzymanalysen bestätigt. Das entstandene Plasmid wurde pBRHtrp genannt.

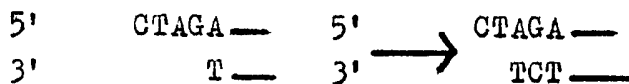
249414 1

-25-

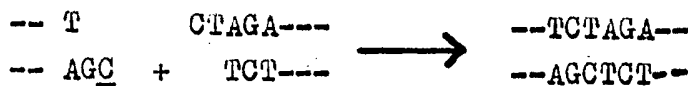
12.9.1983

61 982/12/38

Ein EcoRI- und BamHI-Digestionsprodukt des Genoms des Hepatitis-B-Virus wurde nach bekannten Methoden erhalten und in die EcoRI und BamHI Spaltstellen des Plasmids pGH6 eingefügt (Goeddel et al., Nature 281, 544 [1979]), wodurch das Plasmid pHS32 entstand. Das Plasmid pHS32 wurde mit XbaI gespalten, mit Phenol extrahiert, mit Chloroform extrahiert und der Ethanolpräzipitation unterworfen. Es wurde dann mit 1, μ l E. coli DNS-Polymerase I, Klenow Fragment (Boehringer-Mannheim), in 30, μ l Polymerase-Puffer (50 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 7 mM $MgCl_2$, 1 mM β -Mercaptoethanol), enthaltend 0,1 mM dTTP und 0,1 mM dCTP, während 30 Minuten bei 0 °C und 2 Stunden bei 37 °C behandelt. Durch diese Behandlung wurde die XbaI Spaltstelle folgendermaßen verändert:



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



249414 1

-26-

12.9.1983

61 982/12/38

Diese Plasmide konnten auch mit EcoRI und HpaI gespalten werden und lieferten die erwarteten Restriktionsfragmente. Ein Plasmid, pTrp14 bezeichnet, wurde für die Expression heterologer Peptide, wie im folgenden beschrieben, verwendet.

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

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

249414 1

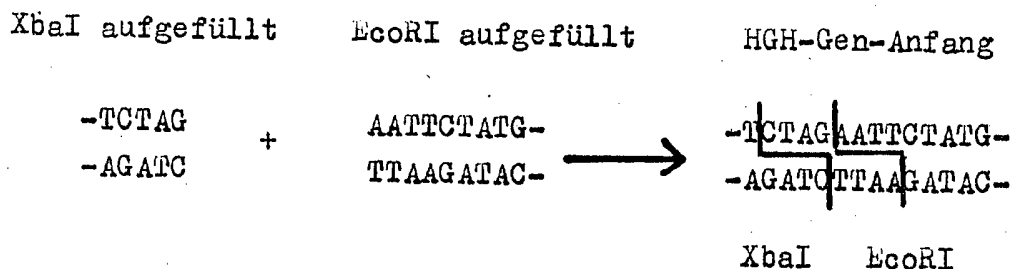
-27-

12.9.1983

61 982/12/38

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

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



Durch diese Konstruktion wurde auch das Tetracyclinresistenz-Gen wiederhergestellt. Weil das Plasmid pHGH 107 Tetracyclinresistenz von einem Promotor, der stromaufwärts vom HGH-Gen (Lac-Promotor) liegt, exprimiert, erlaubt das vorstehend

249414 1

-28-

12.9.1983

61 982/12/38

konstruierte Plasmid, bezeichnet pHGH 207, die Expression des Gens für Tetracyclinresistenz unter der Kontrolle des Tryptophan-Promotor-Operator. Das erhaltene Gemisch wurde in *E. coli* 294 transformiert, und die Kolonien wurden auf LB-Platten, die 5 µg/ml Tetracyclin enthielten, selektioniert.

Das Plasmid pHGH 207 wurde mit EcoRI behandelt, und das den Trp-Promotor enthaltende Fragment wurde mittels PAGE und Elektroelution isoliert. Das Plasmid pBRH1 wurde mit EcoRI behandelt, und die Spaltstellen wurden mit bakterieller alkalischer Phosphatase (BAP, 1 µg, in 50 mM Tris, pH 8, und 10 mM MgCl₂) 30 Minuten lang bei 65 °C behandelt, um die Phosphatgruppen an den vorstehenden EcoRI-Enden zu entfernen. Überschüssige bakterielle alkalische Phosphatase wurde durch Phenolextraktion, Chloroformextraktion und Ethanol-Fällung entfernt. Infolge der an den überstehenden Enden fehlenden Phosphatgruppen kann das erhaltene lineare DNS-Fragment sich nicht selbst zu einem Kreis schließen, sondern nur mit solchen anderen DNS-Fragmenten reagieren, deren kohäsive Enden phosphoryliert sind.

Das EcoRI-Fragment aus pHGH 207 wurde mit dem aus pBRH1 erhaltenen linearen DNS-Fragment in Gegenwart von T₄-Ligase wie vorstehend beschrieben verbunden. Ein Teil des erhaltenen Gemischs wurde zur Transformation von *E. coli* Stamm 294 in der vorstehend beschriebenen Weise verwendet. 12 Tetracyclin-resistente Kolonien wurden selektioniert (LB-Medium mit einem Gehalt von 5 µg/ml Tetracyclin). Aus jeder Kolonie wurde Plasmid-DNS isoliert und durch Behandlung mit EcoRI und XbaI auf das Vorhandensein des gewünschten DNS-Abschnitts untersucht. Ein Plasmid, das den gewünschten Abschnitt enthielt, wurde pHKY1 bezeichnet.

249414 1

-29-

12.9.1983

61 982/12/38

Das Plasmid pHKY10 ist ein Derivat von pBR 322, das eine BglIII-Spaltstelle zwischen dem Tetracyclinresistenz (Tc^R)-Promotor und dem Strukturgen enthält. Das große DNS-Fragment, das nach Behandlung von pHKY10 mit PstI und BglIII isoliert wurde, enthält daher einen Teil des Ampicillinresistenz (Ap^R)-Gene und das gesamte Tc^R -Strukturgen aber nicht den Tc^R -Promotor (Fig. 6). Das Plasmid pGH6 (Goeddel et al., Nature 281, 544 - 548 [1979]) wurde mit EcoRI behandelt, die einsträngigen Enden wurden mit DNS-Polymerase I aufgefüllt und das Plasmid wurde mit PstI gespalten. Das kleine Fragment, enthaltend einen Teil des Ap^R -Gens, einen doppelten Lac-Promotor und die Lac-Ribosomenbindungsstelle, nicht aber den ATG-Startcodon, wurde isoliert. Ein ähnliches Trp-Promotor-Fragment, das die Trp-Leader-Ribosomenbindungsstelle enthält, nicht aber eine ATG-Sequenz (Goeddel et al., Nature 287, 411 - 416 [1980]), kann aus pHKY1 isoliert werden.

Das soeben erwähnte Trp-Fragment ist ein analoges des E. coli-Tryptophan-Operons, aus dem der sogenannte Trp-Attenuator entfernt wurde (Miozzari et al., J. Bact. 133, 1457 - 1466 [1978]), um die Expression kontrolliert zu erhöhen. Expressionsplasmide, die das modifizierte Trp-Regulon enthalten, können bis zu vorgegebenen Konzentrationen in einem Nährmedium, das genügend zusätzliches Tryptophan enthält, um das Promotor-Operator-System zu unterdrücken, gezüchtet werden. Entzug des Tryptophans, wodurch der Promotor-Operator in Aktion tritt, bewirkt die Expression des gewünschten Produktes.

Die Expressionsplasmide können zusammengesetzt werden über 3stufige Verbindungsschritte, wie in Fig. 6 gezeigt, 15 ng (0,05 pM) des FIF-Gens (504 bzw. 505 Basenpaare) 0,5 µg

249414 1

-30-

12.9.1983

61 982/12/38

(0,2 pM) des großen PstI-BglII-Fragments von pHKY10 und 0,2 µg (0,3 pM) des geeigneten Promotorfragments wurden miteinander verbunden, und das Gemisch wurde verwendet zur Transformation von *E. coli* 294 (Goeddel et al., Nature 287, 411 - 416 [1980]). Aus den einzelnen Transformanten wurde Plasmid-DNS isoliert und mittels Restriktionsenzymen analysiert. Bei korrekter Verbindung des FIF-Gens mit dem Promotorfragment wird die EcoRI (Lac)- oder die XbaI (Trp)-Erkennungssequenz wieder hergestellt. Die überwiegende Zahl der Plasmide lieferten das erwartete Restriktionsmuster. Einzelne Klone wurden hochgezüchtet (12 mit dem Trp-Promotor und 12 mit dem Lac-Promotor). Für den Interferon-Assay wurden aus ihnen Extrakte, wie bereits beschrieben, hergestellt.

Im CPE-Hemmtest auf menschlichen Amnionzellen (WISH) waren 5 Trp-Transformanten positiv (alle etwa gleich stark), und 11 der Lac-Transformanten zeigten äquivalente Interferonaktivitäten. Daher wurde aus jeder Serie ein Transformant für die weiteren Untersuchungen ausgesucht (pFIFac9 und pFIFtrp69, Tabelle 1). Die DNS-Sequenzanalyse bestätigte, daß in beiden Fällen die gewünschte Verknüpfung des Promotors an das FIF-Strukturgen stattgefunden hatte.

Tabelle 1

Interferon-Aktivität in Extrakten von *E. coli*

249414 1

-31-

12.9.1983

61 982/12/38

E. coli K-12 Stamm 294 transformiert mit	Zelldichte (Zellen/ml)	IF-Aktivität	
		(E/1 Kultur)	FIF Moleküle pro Zelle
pBR 322	$3,5 \times 10^8$	-	-
pFIFlac9	$3,5 \times 10^8$	$9,0 \times 10^6$	2,250
pFIFtrp69	$3,5 \times 10^8$	$1,8 \times 10^7$	4,500
pFIFtrp ³ 69	$3,5 \times 10^8$	$8,1 \times 10^7$	20,200

Die Züchtung der Zellen und die Herstellung von Extrakte erfolgte in der oben angegebenen Weise. Die menschliche Amnionzelllinie (WISH) wurde für den CPE-Hemmtest verwendet. Die angegebenen Aktivitäten sind Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. Um die Anzahl der Interferonmoleküle pro Zelle zu bestimmen, wurde eine spezifische FIF-Aktivität von 4×10^8 Einheiten/mg verwendet (Knight, supra).

Die mit pFIFlac9 und pFIFtrp69 erhaltenen FIF-Mengen sind in Tabelle 1 wiedergegeben. Der Trp-Promotor lieferte eine höhere Expression als der Lac-Promotor. Um die FIF-Expression weiter zu erhöhen, wurde pFIFtrp69 mit *EcoRI* gespalten, und zwei 300 Basenpaar-lange *EcoRI*-Fragmente, die den Trp-Promotor enthielten (Goeddel et al., Nature 287, 411 - 416 [1980]), wurden eingefügt. Das erhaltene Plasmid, pFIFtrp³69, enthält drei aufeinanderfolgende Trp-Promotoren, die in Richtung des FIF-Gens orientiert sind. Die von E. coli K-12 Stamm 294/pFIF³69 produzierte FIF-Menge ist vier- bis fünfmal so groß wie die von E. coli K-12 Stamm 294/pFIFtrp69 produzierte (Tabelle 1). Das von E. coli K-12 Stamm 294/pFIFtrp69 hergestellte FIF verhält sich wie authentisches

249414 1 -32-

12.9.1983

61 982/12/38

Human-FIF. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, ist seine antivirale Aktivität etwa 30mal größer bei menschlichen Zellen als bei Rinderzellen. Zusätzlich ist das bakteriell hergestellte FIF bei pH 2 über Nacht stabil und wird nicht durch Kaninchen-Anti-Human-Leukozyten-Interferon-Antikörper neutralisiert (Tabelle 3).

Tabelle 2

Interferon-Aktivitäten verschiedener Zelltypen

Zellen	Interferon-Aktivität (E/ml)		
	LeIF	FIF	E. coli K-12 Stamm 294/pFIFtrp69-Extrakt
Amnion (human)	20,000	10,000	1280
Niere (Rind)	13,000	400	40

Tabelle 3:

Vergleich der Interferon-Aktivitäten aus Extrakten von E. coli K-12 Stamm 294/pFIFtrp69 mit Human-LeIF- und -FIF-Standard

	Interferon-Aktivität (E/ml)		
	LeIF	FIF	E. coli K-12 Stamm 294/pFIFtrp69
unbehandelt	1000	1000	1000
pH2	1000	1000	1000
Kaninchen-anti-Human-LeIF-Antikörper	16	1000	1000

249414 1 -33-

12.9.1983

61 982/12/38

LeIF und FIF sind NIH-Standardlösungen mit 20,000 bzw. 10,000 Einheiten/ml.

N. Reinigung

Bakteriell hergestelltes Fibroblasten-Interferon wird folgendermaßen gereinigt:

1. Die gefrorenen Zellen werden in der 12fachen Menge (v/w) eines Saccharosepuffers (100 mM Tris-HCl, 10 % Saccharose, 0,2 m NaCl, 50 mM EDTA, 0,2 mM PMSF Phenylmethylsulfonylchlorid 7, pH 7,9), enthaltend 1 mg/ml Lysozym, suspendiert. Die Zellsuspension wird 1 Stunde bei 4 °C gerührt und zentrifugiert. Die Fibroblasten-Interferonaktivität findet sich im Überstand.
2. Der mit Ultraschall behandelte Überstand wird mit 5%iges Polyethylenimin (v/v) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 % (v/v) versetzt. Die Lösung wird 1 Stunde bei 4 °C gerührt und dann zentrifugiert, Die Interferonaktivität verbleibt im Überstand.
3. Der Überstand wird mit festem Ammoniumsulfat bis zu einer Endkonzentration von 50 % versetzt, 30 Minuten bei 4 °C gerührt und zentrifugiert. Die Interferonaktivität befindet sich im Niederschlag.
4. Der Ammoniumsulfatniederschlag wird in PBS (20 mM Natriumphosphat, 0,15 m NaCl, pH 7,4) suspendiert und zwar in einem Volumen, das halb so groß ist wie das der 50%igen Ammoniumsulfat-Suspension. Es wird Polyethylenglykol 6000 (50 %, w/v, in PBS) zugesetzt bis zu einer Endkon-

249414 1

-34-

12.9.1983

61 982/12/38

zentration von 12,5 % (v/v), 2 Stunden bei 4 °C gerührt und zentrifugiert. Die Interferonaktivität befindet sich im Niederschlag, der in einer minimalen Menge des unter (1) definierten Saccharosepuffers suspendiert und durch Zentrifugieren geklärt wird.

Durch dieses Extraktionsverfahren wird eine Anreicherung des Fibroblasten-Interferons von 0,001 % Gesamtprotein auf 0,05 % Gesamtprotein erreicht. Das Material kann weiter bis zur Homogenität durch folgende säulenchromatographischen Verfahren gereinigt werden:

5. Affinitätschromatographie an Amicon-Blau B in dem unter (1) definierten Saccharosepuffer.
6. Anionenaustauschchromatographie an QAE Sephadex in dem unter (1) definierten Saccharosepuffer bei Abwesenheit von 0,2 M NaCl.
7. Größenausschlußchromatographie an Sephadex G-75 in dem unter (1) definierten Saccharosepuffer.
8. HPLC an Umkehrphasen.

0. Parenterale Applikation

FIF kann parenteral verabreicht werden an Individuen, die eine antitumor- oder antivirale Behandlung benötigen und in solche, die immundepressive Zusätze aufweisen. Die Dosierung kann sich an die des zur Zeit in klinischer Prüfung befindlichen Materials, das aus menschlichen Zellen gewonnen wurde, anlehnen und kann z. B. etwa $1 - 10 \times 10^6$

249414 1

-35-

12.9.1983

61 982/12/38

Einheiten/Tag, im Fall von Material mit einer Reinheit, die größer ist als 1 %, bis zu etwa 15×10^7 Einheiten/Tag betragen. Die Dosierungen von bakteriell hergestelltem FIF können zur Erzielung eines besseren Effekts markant erhöht werden, wegen der höheren Reinheit und der weitgehenden Abwesenheit anderer Human-Proteine, die als Pyrogene wirken können und für unerwünschte Nebenwirkungen verantwortlich sein kann, beispielsweise erhöhte Temperatur, Übelkeit usw.

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

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

249414 1 -36-

12.9.1983

61 982/12

Erfindungsanspruch

209652

1. Verfahren zur Herstellung eines replikablen, in einem Mikroorganismus die Expression eines Polypeptids mit der Aminosäuresequenz eines reifen Human-Fibroblasten-Interferons ohne Präsequenz oder Teil einer solchen bewirkenden Vektors, gekennzeichnet dadurch, daß man eine dieses Polypeptid codierende erste DNS-Sequenz operabel mit einer zweiten DNS-Sequenz, die die für die Expression notwendigen Codons enthält, verbindet.
2. Verfahren nach Punkt 1, gekennzeichnet dadurch, daß die zweite DNS-Sequenz einen mehrfachen Trp-Promotor-Operator enthält.

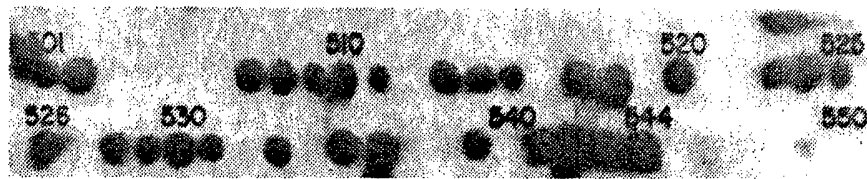
Hierzu 6 Seiten Zeichnungen

239414 1

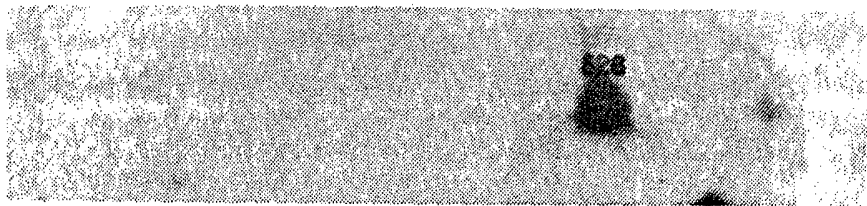
Protein1 2 3 4
Met-Ser-Tyr-Asn-mRNS(5') AUG-UC^G_A-UA^U_C-AA^U_C (16 Kombinationen)(5') AUG-AG^U_C-UA^U_C-AA^C_U (8 Kombinationen)komplementäre DNS-StarterATT-^A_GTA-^T_CGA-CAT Pool 1ATT-^A_GTA-^A_GGA-CAT Pool 2ATT-^A_GTA-^A_GCT-CAT Pool 3GTT-^A_GTA-^T_CGA-CAT Pool 4GTT-^A_GTA-^A_GGA-CAT Pool 5GTT-^A_GTA-^A_GCT-CAT Pool 6*FIG. 1.*

249414 1

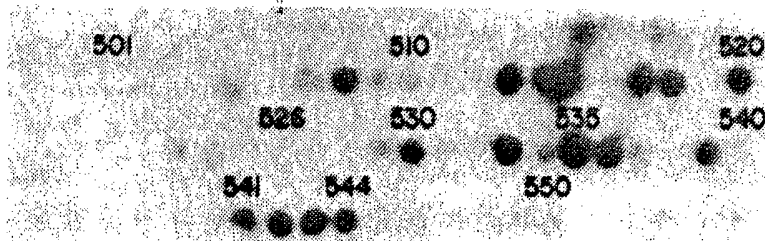
A



B



C

*FIG. 2.*

2.5414 1

5'
 S1
 met thr asn lys cys leu leu gln ile ala leu leu leu cys phe ser thr thr ala leu ser MET SER TYR ASN
 ATG ACC AAC AAG TGT CTC CTC CAA ATT GCT CTC CTG TTG TGC TTC TCC ACT ACA GCT CTT TCC ATG AGC TAC AAC
 50
 10 20
 LEU LEU GLY PHE LEU GLN ARG SER SER ASN PHE GLN CYS GLN LYS LEU LEU TRP GLN LEU ASN GLY ARG LEU GLU
 TTG CTT GGA TTC CTA CAA AGA AGC AGC AAT TTT CAG TGT CAG AAG CTC CTG TGG CAA TTG AAT GGG AGG CTT GAA
 100 150
 30 40 50
 TYR CYS LEU LYS ASP ARG MET ASN PHE ASP ILE PRO GLU GLU ILE LYS GLN LEU GLN GLN PHE GLN LYS GLU ASP
 TAT TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC CCT GAG GAG ATT AAG CAG CTG CAG CAG TTC CAG AAG GAG GAC
 200
 60 70
 ALA ALA LEU THR ILE TYR GLU MET LEU GLN ASN ILE PHE ALA ILE PHE ARG GLN ASP SER SER SER THR GLY TRP
 GCC GCA TTG ACC ATC TAT GAG ATG CTC CAG AAC ATC TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT AGC ACT GGC TGG
 250 300
 80 90 100
 ASN GLU THR ILE VAL GLU ASN LEU LEU ALA ASN VAL TYR HIS GLN ILE ASN HIS LEU LYS THR VAL LEU GLU GLU
 AAT GAG ACT ATT GTT GAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA GTC CTG GAA GAA
 350
 110 120
 LYS LEU GLU LYS GLU ASP PHE THR ARG GLY LYS LEU MET SER SER LEU HIS LEU LYS ARG TYR TYR GLY ARG ILE
 AAA CTG GAG AAA GAA GAT TTT ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA AGA TAT TAT GGG AGG ATT
 400 450
 130 140 150
 LEU HIS TYR LEU LYS ALA LYS GLU TYR SER HIS CYS ALA TRP THR ILE VAL ARG VAL GLU ILE LEU ARG ASN PHE
 CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AGT CAC TGT GCC TGG ACC ATA GTC AGA GTG GAA ATC CTA AGG AAC TTT
 500
 160 166
 TYR PHE ILE ASN ARG LEU THR GLY TYR LEU ARG ASN END
 TAC TTC ATT AAC AGA CTT ACA GGT TAC CTC CGA AAC TGA AGATCTCCTAGCCTGTCCCTCTGGGACTGGACAATTGCTTCAAGCA
 550 600
 TTCTTCAACCAGCAGATGCTGTTTAAAGTGACTGATGGCTAATGTACTGCAAAATGAAAGGACACTAGAAGATTTTGAAATTTTATTAAATTATGAGTT
 650 700
 ATTTTATTATTATTAAATTTTATTTTGGAAAATAAATTATTTTGGTGCAAAA
 750
 3'

Fig. 3.

249414 1

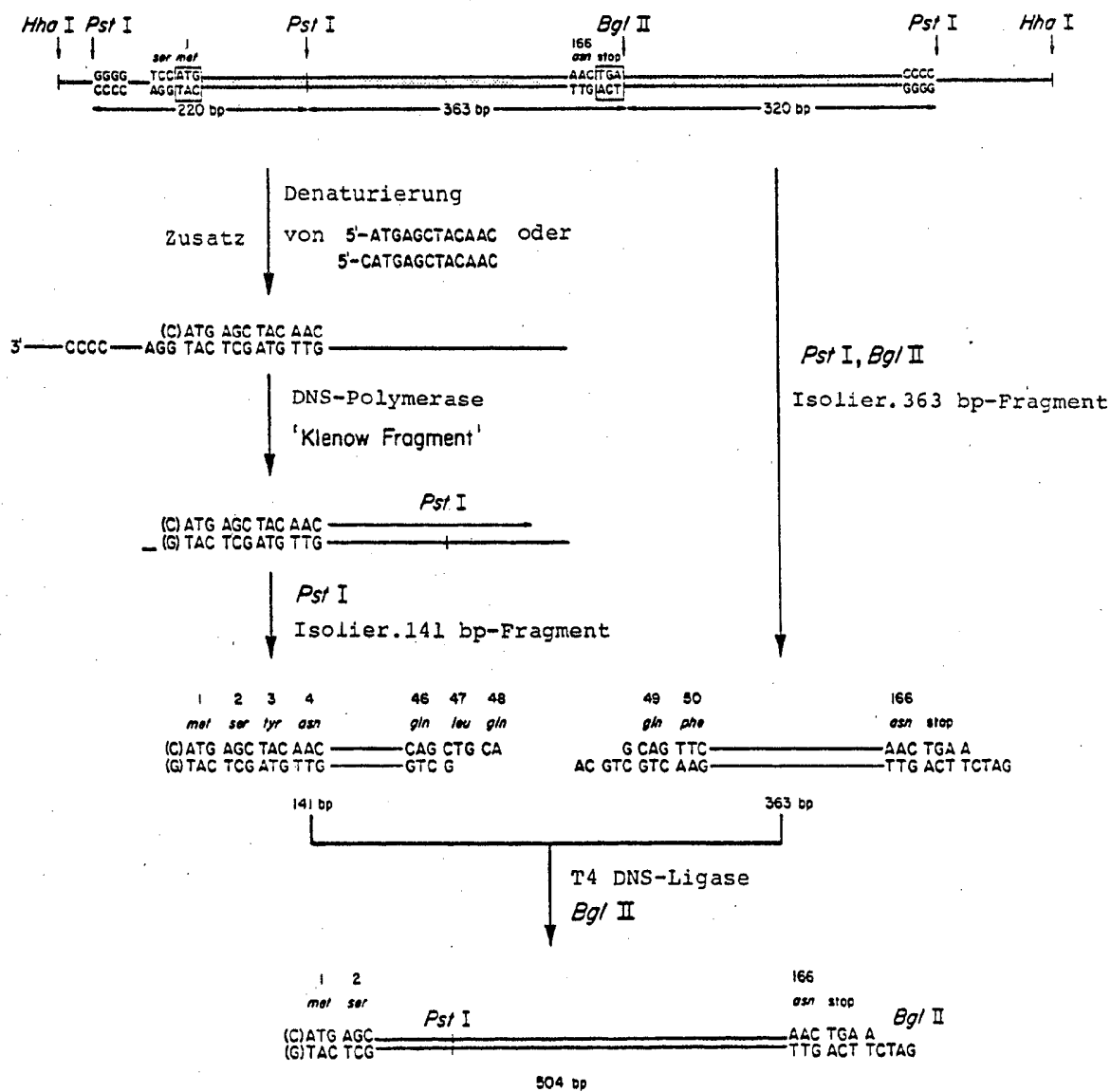
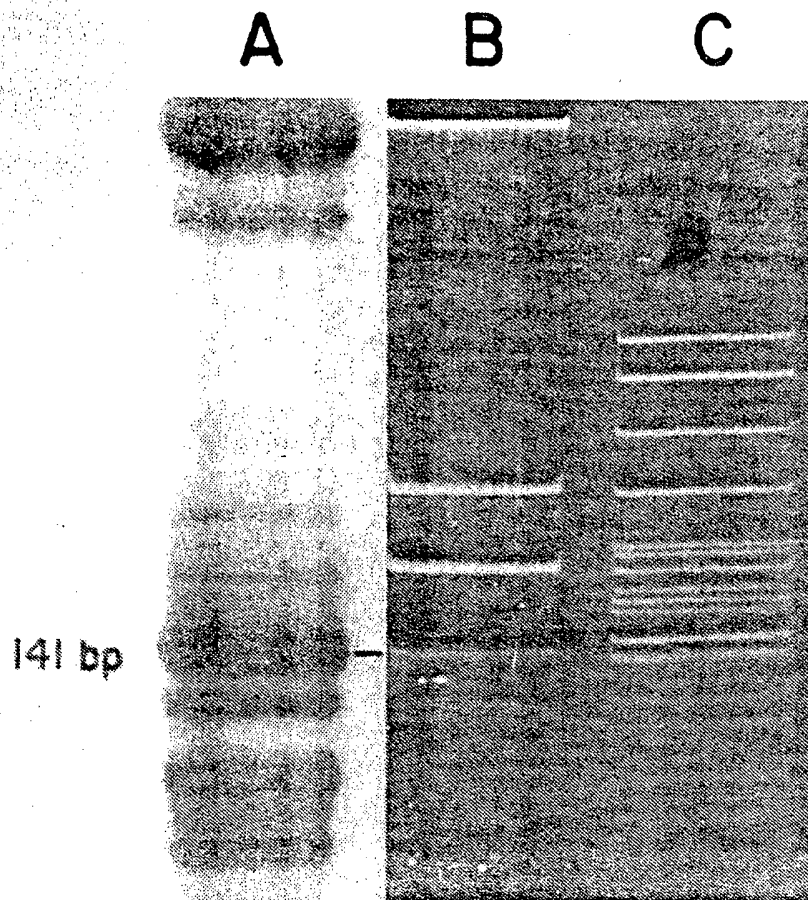


FIG. 4

249414 1

*FIG. 5.*

249414 1

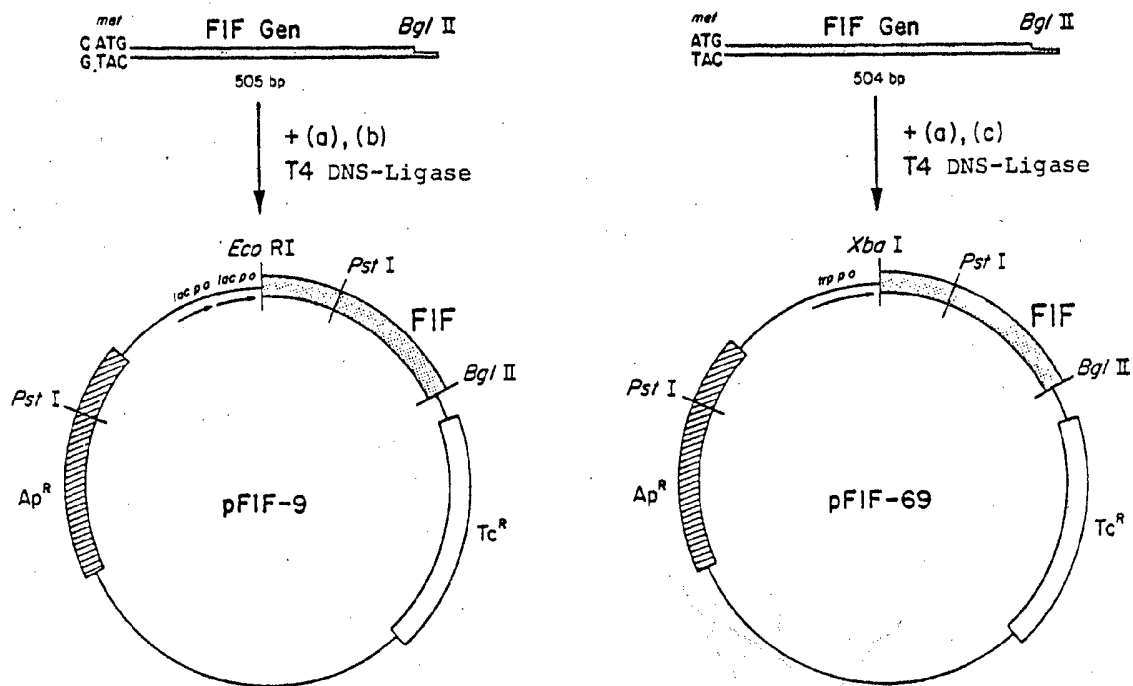
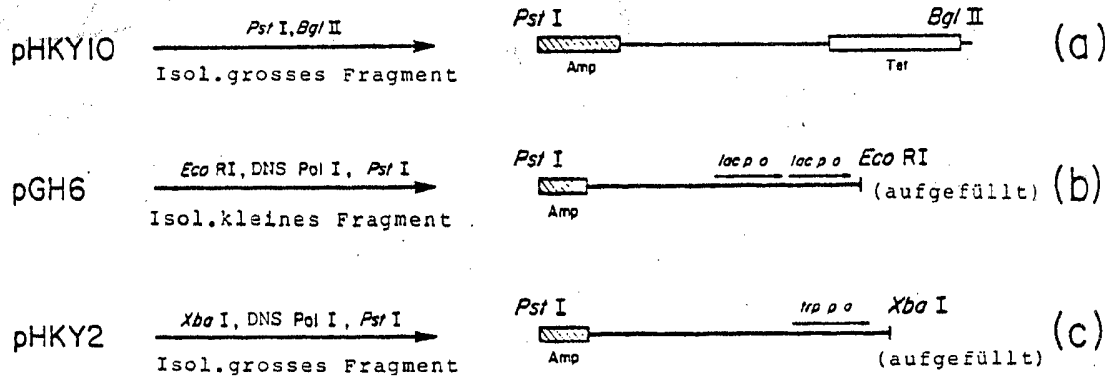


FIG. 6.