



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1551/84

(22) Indleveringsdag: 13 mar 1984

(41) Alm. tilgængelig: 15 sep 1984

(44) Fremlagt: 06 maj 1991

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 14 mar 1983 JP 42042/83

(51) Int.Cl.⁵

C 07 K 13/00

C 07 K 15/26

C 12 N 15/23

C 12 N 15/70

(71) Ansøger: *Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.; 6-1, Ohtemachi Itchome; Chiyoda-ku; Tokyo, JP, *Juridical Foundation Japanese Foundation for Cancer Research; 1-37-1, Kami-ikebukuro; Toshima-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Seiga *Itoh; JP, Tatsunari *Nishi; JP, Tadatsugu *Taniguchi; JP, Haruo *Sugano; JP

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

(54) **Humant interferon-gamma-polypeptid og fremgangsmåde til fremstilling deraf, rekombinant plasmid omfattende et DNA-fragment, som koder for peptidet, og mikroorganisme transformeret med plasmidet**

(56) Fremdragne publikationer

EP off.g. skrift nr. 77670

Andre publikationer. Nature bind 295 (1982) side 403-409
Nucleic Acids Research bind 10 (1982)
side 3605-3615

(57) Sammen drag:

1551-84

Et hidtil ukendt humant interferon- γ -polypeptid fremstilles ved dyrkning af en mikroorganisme transformeret med et rekombinant plasmid, hvori der, fortrinsvis efter en tryptophan-promotor, er inkorporeret et DNA-fragment, som koder for det humane interferon- γ -polypeptid. Specielt anvendes mikroorganismen *Escherichia coli* IGC-7 (FERM P-6814), (FERM BP-497), som er transformeret med det rekombinante plasmid pGC-7, eller mikroorganismen *Escherichia coli* IGKA-2 (FERM P-6798), (FERM BP-496), som er transformeret med det rekombinante plasmid pGKA-2.

Opfindelsen angår et hidtil ukendt humant interferon- γ -
polypeptid og en fremgangsmåde til fremstilling deraf
samt et rekombinant plasmid omfattende et DNA-fragment,
som koder for peptidet, og en mikroorganisme, som er
5 transformeret med plasmidet.

Interferoner (i det følgende betegnet med IFN) kan efter
den nuværende viden klassificeres i tre store grupper,
IFN- α , IFN- β og IFN- γ . IFN- α produceres hovedsageligt
fra leukocyter, IFN- β fra fibroblaster og IFN- γ fra
10 T-lymphocyter. Disse interferoner er blevet noteret
som biologisk aktive stoffer med anti-virus-aktivitet,
aktiverende aktiviteter på naturlige dræberceller og
makrofager, anti-tumor-aktivitet og lignende. Imidlertid
kan konventionelle metoder til opnåelse af interferoner
15 ved isolering fra leukocyter og dyrkede celler ikke
give dem i tilstrækkelig grad og tilstrækkelig renhed.

Rekombinant-DNA-teknologi er nu blevet udviklet i en
sådan grad, at masseproduktion af stoffer, som kun se-
cernerer i lille mængde i celler hos højere dyr, og
20 som er vanskelige at isolere, såsom IFN, er blevet mu-
lig ved anvendelse af mikroorganismer. F.eks. blev mRNA'er
for henholdsvis IFN- β og IFN- α isoleret fra celler,
og cDNA komplementært til mRNA'en blev syntetiseret
enzymatisk, indsat i et egnet plasmid som en dobbelt-
25 strenget DNA og klonet i *Escherichia coli* [Taniguchi,
et al.: Proc. Jap. Acad., 55(B), 464 - 469 (1979); Na-
gata, et al.: Nature 284, 316 - 320 (1980)].

Hvad angår IFN- γ har der været en rapport om, at det
har en stærkere celleinhiberende aktivitet end andre
30 interferoner, baseret på forsøg under anvendelse af
dyreceller [B.Y. Rubin and S.L. Gupta: Proc. Natl. Acad.
Sci., USA, 77, 5928 - 5932 (1980)].

Gray et al., Nature, bind 295 (1982), side 503-509;
Derynck et al., Nucleic Acids Research, bind 10, nr.
12 (1982), side 3605-3615; og EP offentliggørelsesskrift
nr. 77670, offentliggjort d. 27. april 1983, beskriver
5 kloningen af en IFN- γ -DNA i Escherichia coli og bestem-
melse af dens basesekvens, og Gray et al. anfører, at
IFN- γ tilskrives et bredt område af biologiske aktivi-
teter, herunder forstærkning af de antivirale aktiviteter
af IFN- α og - β , men først og fremmest som immunoregula-
10 torisk middel. I EP offentliggørelsesskriftet beskrives
også det udtrykte interferon- γ -polypeptid, som omfatter
146 aminosyrerester, hvor aminosyreresten nr. 9 er Lys.

Ifølge den foreliggende opfindelse inkorporeres en hidtil
ukendt IFN- γ -DNA, som koder for et hidtil ukendt IFN- γ -
15 polypeptid, der er forskelligt fra det ovennævnte kendte
IFN- γ -polypeptid ved, at aminosyre nr. 9 er Gln i stedet
for Lys, i et rekombinant plasmid og udtrykkes i en
mikroorganisme, især i Escherichia coli.

Det har vist sig, at aktiviteten af humant interferon-
20 γ forøges i serum ved 37 °C på grund af indvirkning
af enzymer i serum, såsom protease, og at aktivitets-
forøgelsen er meget større for IFN- γ -polypeptidet ifølge
opfindelsen end for det kendte IFN- γ -polypeptid. Dette
er en meget stor fordel ved klinisk anvendelse.

Opfindelsens formål er således at tilvejebringe et rekom-
binant plasmid, hvori der er inkorporeret en hidtil ukendt
IFN- γ -DNA, en mikroorganisme indeholdende plasmidet,
en fremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt
humant IFN- γ -polypeptid under anvendelse af mikroor-
25 ganismen og det humane IFN- γ -polypeptid som sådant.
30

Det hidtil ukendte polypeptid ifølge opfindelsen er
ejendommeligt ved, at det har den aminosyresekvens,

som er belyst i fig. 3.

Det rekombinante plasmid ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved, at det har inkorporeret et DNA-fragment, som koder for et humant interferon- γ -polypeptid med
5 den basesekvens, som er belyst i fig. 3, efter en tryptophanpromotor.

Mikroorganismen ifølge opfindelsen er ejendommelig ved, at den indeholder et rekombinant plasmid ifølge opfindelsen.

10 Endelig er fremgangsmåden ifølge opfindelsen ejendommelig ved, at en mikroorganisme transformeret med et rekombinant plasmid, hvori der er inkorporeret et DNA-fragment, som koder for humant interferon- γ -polypeptid,
15 dyrkes i et næringsmedium, og at det dannede humane interferon- γ -polypeptid udvindes fra dyrkningsmediet.

Kort beskrivelse af tegningerne:

fig. 1 er et arbejdsdiagram, som belyser konstruktionen af plasmid pGC-7.

5 Fig. 2 er et arbejdsdiagram, som belyser konstruktionen af plasmid pGKA-2.

Fig. 3 belyser basesekvensen omkring den humane IFN- γ -DNA i plasmid pGKA-2.

Fig. 4 (A) belyser strukturen af plasmid pKYP-1, og (B) belyser strukturen af plasmid pKYP-5.

10 Fig. 5 er et arbejdsdiagram, som belyser konstruktionen af pKYP-5.

Fig. 6 er et arbejdsdiagram, som belyser konstruktionen af pKYP-10.

15 Fig. 7 (A) er et arbejdsdiagram, som belyser konstruktionen af pKYP-11, og (B) belyser strukturen af pKYP-12.

Konstruktionen af det rekombinante plasmid udføres på følgende måde.

20 Som den hidtil ukendte humane IFN- γ -DNA anvendtes pIFN- γ -G4, som var klonet af opfinderne. Escherichia coli indeholdende pIFN- γ -G4 er blevet deponeret hos the American Type Culture Collection, U.S.A., under accessionsnummeret ATCC 39123.

25 Basesekvensen af IFN- γ -DNA'en i pIFN- γ -G4 blev bestemt ved den metode, som er beskrevet af Maxam and Gilbert [Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 560 (1977)] og er belyst i fig. 3.

Sammenligning af den humane IFN- γ -cDNA i pIFN γ -G4 og den kendte IFN- γ -cDNA [P.W. Gray, et al.: Nature 295, 503 (1982)] afslører følgende: den første base i tripletten, der koder for den 9. aminosyre fra N-terminalen i det modne humane IFN- γ -polypeptid, lysin, er i den kendte cDNA adenin [Gray et al.: Nature 295, 503 (1982)]. Da på den anden side den tilsvarende base i pIFN γ -G4-cDNA er cytosin, er den 9. aminosyre fra N-terminalen i det humane IFN- γ -polypeptid, som er indkodet i pIFN γ -G4-cDNA, glutamin og ikke lysin. Derfor er det klart, at pIFN γ -G4 koder for et hidtil ukendt humant IFN- γ -polypeptid.

Endvidere har pIFN γ -G4 et RsaI-restriktionssted, da den 25. base er C. Dvs. sekvensen af den 22. til 25. base fra 5'-terminalen af IFN γ -DNA'en i pIFN γ -G4 er GTAC, og RsaI klipper DNA'en i den position, som er vist ved pilen (GT↓AC).

Da ingen af de kendte IFN- γ -gener har et RsaI-sted i et DNA-område, der koder for IFN- γ -polypeptid, er det klart, at pIFN γ -G4 indeholder en DNA, der koder for et hidtil ukendt humant IFN- γ -polypeptid.

Derfor er rekombinante plasmider konstrueret under anvendelse af pIFN γ -G4 alle hidtil ukendte rekombinante plasmider.

Som plasmid til at inkorporere IFN- γ -DNA kan anvendes ethvert plasmid, blot den deri inkorporerede DNA udtrykkes i Escherichia coli. Fortrinsvis anvendes et plasmid, hvori en fremmed DNA kan indsættes efter en egnet promotor, såsom trp-motoren eller lac-promotoren, og længden mellem Shine-Dalgarno-sekvensen (i det følgende betegnet som SD-sekvens) og translations-start-stedet er indstillet til f.eks. 6 - 18 basepar. Foretrukne

eksempler er pKYP-10, pKYP-11 og pKYP-12, som blev konstrueret af opfinderne [japansk patentansøgning nr. 213193/81 (japansk offentliggørelsesskrift nr. 110600/83)]. Disse udtrykkelsesvektorer fremstillet ved den fremgangsmåde, som er belyst i referenceeksempel 1, indeholder tryptophan-promotorer (i det følgende betegnet som Ptrp).

Det rekombinante plasmid pGC-7 fremstilles ud fra pKYP-11 og pIFN γ -G4 som belyst i fig. 1. Dvs. pIFN γ -G4 nedbrydes med PvuII og HindIII, og nedbrydningsproduktet renses ved gelelektroforese på agarose med lav gелeringstemperatur. [L. Wieslander, Analytical Biochemistry 98, 305 (1979)]. Det resulterende fragment af IFN γ -G4 indsættes i pKYP-11 ved HindIII-BamHI-stedet til opnåelse af pGC-7.

Derefter klippes pGC-7, som belyst i fig. 2 med BstNI og SalI, og IFN- γ -DNA renses ved gelelektroforese på agarose med lav gелeringstemperatur. IFN- γ -DNA'en klones sammen med en syntetisk DNA i HindIII-SalI-stedet på udtrykkelsesvektoren pKYP-10, der indeholder Ptrp, til opnåelse af det rekombinante plasmid pGKA-2.

IFN- γ -polypeptidet ifølge opfindelsen fremstilles på følgende måde.

Escherichia coli K-12 HB101 [S.N. Cohen, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., 69, 2110 (1972)] transformeres med pGKA-2, og en Escherichia coli-stamme indeholdende pGKA-2 selekteres fra kolonier, som er resistente over for ampicillin (i det følgende betegnet som Ap^R). Escherichia coli-stammen indeholdende pGKA-2 dyrkes i et medium til produktion af IFN- γ -polypeptid i mediet.

Som medium kan anvendes enten et syntetisk eller et naturligt medium, blot det er egnet for væksten af Escherichia coli og produktionen af IFN- γ -polypeptid.

Som carbonkilde kan anvendes glucose, fructose, lactose, glycerol, mannitol, sorbitol, osv.

Som nitrogenkilde kan anvendes NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, cas-aminosyre, gærekstrakt, polypepton, kødekstrakt, bacto-trypton, majsstøbevand osv.

Desuden kan der anvendes næringsstoffer, såsom NH_2HPO_4 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , NaCl , MgSO_4 , vitamin B_1 og MgCl_2 .

Dyrkningen udføres ved pH 5,5 - 8,5 og ved 18 - 40 °C med beluftning og omrøring.

10 Efter dyrkning i 5 - 90 timer er det humane IFN- γ -polypeptid akkumuleret i de dyrkede celler. De opsamlede celler behandles med lysozym, brydes ved gentagen frysning og smeltning og underkastes centrifugering. Den således opnåede supernatante væske underkastes ekstraktion ifølge en konventionel metode til ekstraktion af polypeptider for at udvinde IFN- γ -polypeptidet.

Bestemmelsen af det humane IFN- γ udføres ifølge den metode, der er beskrevet af J.A. Armstrong et al.: Appl. Microbiol. 21, 723 - 725 (1971).

20 Nogle specifikke udførelsesformer af opfindelsen belyses ved de følgende eksempler.

EKSEMPEL 1

Indsætning af human IFN- γ -DNA i udtrykkelsesvektoren pKYP-11:

25 6 μg plasmid pIFN- γ -G4 [3,6 kilobaser (i det følgende betegnet som kb)] blev opløst i 50 μl af en opløsning indeholdende 20 mM "Tris"-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl_2 ,

10 mM dithiothreitol og 50 mM NaCl. Derpå tilsattes
12 enheder hver af restriktionsenzymene PvuII (produkt
fra Takara Shuzo Co.; dette gælder alle følgende restriktions-
5 enzym, med mindre andet er anført) og HindIII,
og nedbrydningsreaktionen udførtes ved 37 °C i 4 timer.
Reaktionsopløsningen blev opvarmet til 65 °C i 7 minutter
for at inaktivere enzymerne og blev derpå underkastet
rensning ved gelelektroforese på agarose med lav
10 gelyeringstemperatur til opnåelse af 1,2 µg af et DNA-
fragment indeholdende human IFN-γ-DNA på 1,3 kb.

Separat blev 4 µg pKYP-11 opløst i 40 ml af en opløsning
indeholdende 20 mM "Tris"-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂,
10 mM dithiothreitol og 50 mM NaCl. Der tilsattes 8
enheder BamHI, og nedbrydningsreaktionen udførtes ved
15 37 °C i 3 timer. Reaktionsopløsningen blev opvarmet
til 65 °C i 5 minutter for at inaktivere enzymet. Derefter
tilsattes 30 µM hver af dATP, dCTP, dGTP og dTTP
og 8 enheder Escherichia coli DNA-polymerase I (Klenow-
fragment, produkt fra New England Biolabs, 1 µl). Ud-
fyldningsreaktionen udførtes ved 15 °C i 1 time, og
20 reaktionsopløsningen blev opvarmet til 68 °C i 15 minutter
for at inaktivere DNA-polymerase I. Der tilsattes
10 enheder HindIII, og nedbrydningsreaktionen udførtes
ved 37 °C i 3 timer, efterfulgt af opvarmning til 65
25 °C i 5 minutter for at inaktivere HindIII-enzymet. Ned-
brydningsopløsningen af plasmidet pKYP-11 blev under-
kastet rensning ved gelelektroforese på agarose med
lav gelyeringstemperatur til opnåelse af omkring 2,5
µg af et DNA-fragment på omkring 4,7 kb indeholdende
30 P_{trp}.

Derpå blev 0,5 µg af DNA-fragmentet på 1,3 kb indehol-
dende human IFN-γ-DNA og 1,0 µg af DNA-fragmentet på
omkring 4,7 kb indeholdende P_{trp}, som var opnået fra
plasmidet pKYP-11, opløst i 20 µl af en opløsning in-

deholdende 20 mM "Tris"-HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol og 500 μ M ATP, og der tilsættes 4 enheder T4-DNA-ligase (produkt fra New England Biolabs). Ligeringsreaktionen udførtes ved 4 °C i 18 timer, og

5 Escherichia coli HB101 blev transformeret med den opnåede rekombinant-plasmid-blanding ved konventionel teknik til opnåelse af en Ap^R-koloni. Et plasmid, pGC-7 vist i fig. 1, blev udskilt fra dyrkningsvæsken. Strukturen af pGC-7 blev bekræftet ved nedbrydning med HindIII,

10 BamHI, HpaI, Sall, EcoRI og ClaI og agarosegelelektroforese. En Escherichia coli-stamme indeholdende pGC-7 er blevet deponeret hos the Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology (i det følgende betegnet som FERM) som Escherichia coli

15 IGC-7 (FERM P-6814), (FERM BP-497).

EKSEMPEL 2

Konstruktion af det rekombinante plasmid pGKA-2:

6 μ g af pGC-7-DNA'en opnået i eksempel 1 blev opløst i 50 μ l af en opløsning indeholdende 20 mM "Tris"-HCl

20 (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 10 mM NaCl, og der tilsættes 12 enheder BstNI (produkt fra New England Biolabs). Reaktionen udførtes ved 60 °C i 3 timer. Derpå tilsættes 150 mM NaCl og 8 enheder Sall, og nedbrydningsreaktionen udførtes ved 37 °C i

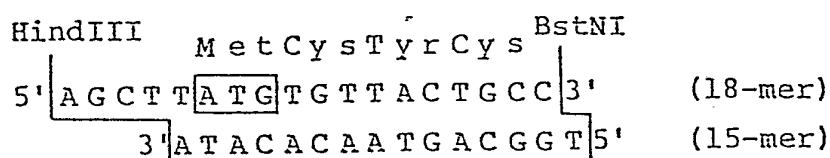
25 3 timer. Reaktionsopløsningen blev igen opvarmet til 65 °C i 5 minutter for at inaktivere Sall-enzymet og blev underkastet rensning ved gelelektroforese på agarose med lav geleringstemperatur til opnåelse af omkring

30 0,8 μ g af et DNA-fragment på omkring 1125 basepar (i det følgende betegnet som bp) indeholdende en stor portion af den humane IFN- γ -DNA.

Separat blev 3 μ g pKYP-10 opløst i 40 μ l af en opløs-

ning indeholdende 20 mM "Tris"-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 100 mM NaCl. Der tilsattes 6 enheder hver af HindIII og SalI, og nedbrydningsreaktionen udførtes ved 37 °C i 3 timer. Reaktionsopløsningen blev opvarmet til 65 °C i 5 minutter for at inaktivere HindIII og SalI og blev underkastet rensning ved gelelektroforese på agarose med lav gелeringstemperatur til opnåelse af omkring 1,8 µg af et DNA-fragment på omkring 4,1 kb indeholdende Ptrp.

Den N-terminale aminosyre i det modne humane IFN-γ-polypeptid er cystein (Cys). For at udtrykke modent IFN-γ-DNA er det nødvendigt at tilvejebringe en startcodon (ATG) lige før den 5'-terminale codon TGT (Cys) og yderligere at indstille længden mellem SD-sekvensen og ATG til en passende længde på 6 - 18 bp. Derfor syntetiseredes den følgende DNA-linker.



To enkeltstrengs 18-mere og 15-mere DNA'er blev syntetiseret ved en konventionel triester-metode [R. Crea et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 5765 (1978)]. Derpå blev 2 µg hver af den 18-mere og den 15-mere DNA opløst i 20 µl af en opløsning indeholdende 50 mM "Tris"-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA og 1 mM ATP. Der tilsattes 30 enheder T4-poly-nucleotidkinase (produkt fra Boehringer Mannheim), og phosphoryleringsreaktionen udførtes ved 37 °C i 60 minutter.

Derpå blandedes 2 µg hver af de phosphorylerede 18-mere og 15-mere DNA'er, og blandingen blev opvarmet til 70

°C i 5 minutter og fik lov at stå ved stuetemperatur til sammensmeltning og opnåelse af DNA-linkeren med den ovenfor angivne struktur.

0,4 µg af det ovenfor fremstillede BstNI-SalI-fragment på 1125 bp afledt fra pGC-7 og 1,0 µg af DNA-fragmentet på 4,1 kb opnået ved nedbrydning af udtrykkelsesvektoren pKYP-10 med HindIII og SalI blev opløst i 25 µl af en opløsning indeholdende 20 mM "Tris"-HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol og 500 µM ATP. Der sættes omkring 0,1 µg af den ovennævnte DNA-linker til blandingen, efterfulgt af tilsætning af 6 enheder T4-DNA-ligase. Ligeringsreaktionen udførtes ved 4 °C i 17 timer. Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den opnåede rekombinant-plasmidblanding ved konventionel teknik til opnåelse af en Ap^R-koloni. Et plasmid, pGKA-2 vist i fig. 2, blev isoleret fra koloniens dyrningsvæske. Strukturen af pGKA-2 blev bekræftet ved nedbrydning med EcoRI, ClaI, HindIII, BstNI og SalI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved den metode, som er beskrevet af A.M. Maxam et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., 74, 560 (1977), at base-sekvensen fra SD-sekvensen (AAGG) til startcodonen (ATG) i plasmidet pGKA-2 er "AAGGGTATCGATAAGCTTATG".

Den humane IFN-γ-DNA i pGKA-2 er forskellig fra kendte DNA'er ved, at DNA'en har et RsaI-sted, og at den 9. aminosyre i det humane IFN-γ-polypeptid, som er indkodet i DNA'en, er glutamin (Gln).

Endvidere er den ovenfor anvendte syntetiserede DNA forskellig fra den, der blev anvendt af P.W. Gray et al., og som har den følgende struktur:

```

      m e t c y s t y r c y s
A A T T C A T G T G T T A T T G T C
      G T A C A C A A T A A C A G T

```

- i de understregede dele. Således har pGKA-2 et restriktionssted for BstNI, CCAGG, i DNA-området, der koder for humant IFN- γ , og dette træk adskiller også pGKA-2 fra kendte plasmider. Endvidere er længden og strukturen mellem SD-sekvensen og ATG vigtig på grund af indflydelsen på udtrykkelsen af proteiner i *Escherichia coli*. Basesekvensen mellem SD-sekvensen og ATG i pGKA-2 er øjensynligt forskellig fra den, der findes i det kendte rekombinante plasmid pIFN- γ trp48 (P.W. Gray et al.)
- 5
- 10 *Escherichia coli* indeholdende pGKA-2 er blevet deponeret hos FERM som *Escherichia coli* IGKA-2 (FERM P-6798), (FERM BP-496).

EKSEMPEL 3

- 15 Produktion af interferon ved hjælp af *Escherichia coli* IGC-7 og IGKA-2:

- Escherichia coli* HB101 stammer indeholdende de rekombinante plasmider pGC-7 og pGKA-2 opnået i eksempel 1 og 2 (henholdsvis IGC-7 og IGKA-2) blev dyrket ved 37 °C i 18 timer i et LG-medium bestående af 10 g/l trypton, 5 g/l gærekstrakt, 5 g/l NaCl og 2 g/l glucose og indstillet til pH 7,0 med NaOH. Derpå blev 0,2 ml af dyrkningsmediet indpodet i 10 ml af et MCG-medium (pH 7,2) bestående af 0,6 % Na_2HPO_4 , 0,3 % KH_2PO_4 , 0,5 % NaCl, 0,1 % NH_4Cl , 0,5 % glucose, 0,5 % casamiosyre, 1 mM MgSO_4 og 4 $\mu\text{l/ml}$ vitamin B_1 . Dyrkningen udførtes ved 30 °C i 4 - 8 timer. Derpå tilsattes 10 $\mu\text{g/ml}$ indolacrylsyre (i det følgende betegnet som IAA), som er en induktor for tryptophangenet, og dyrkningen fortsattes i yderligere 2 - 12 timer. Cellerne blev indhøstet ved centrifugering ved 8000 omdr./min. i 10 minutter og vasket med pufferopløsning indeholdende 30 mM NaCl og 30 mM "Tris"-HCl (pH 7,5). De vaskede celler blev
- 20
- 25
- 30

suspenderet i 1 ml af den ovennævnte pufferopløsning, og der tilsattes 200 μ g lysozym og 5 μ l 0,25 M EDTA (ethyldiamintetraeddikesyre). Blandingen fik lov at stå ved 0 °C i 30 minutter. Frysning og smeltning blev gentaget 3 gange for at bryde cellerne. De brudte celler blev centrifugeret ved 15000 omdr./min. i 30 minutter til opnåelse af en supernatant væske. Mængden af interferon i supernatanten blev bestemt ifølge den metode, som er beskrevet af J.A. Armstrong et al.: Appl. Microbiol. 21, 723 - 725 (1971), hvorved der som virus anvendtes Sindvis-virus og som dyrecelle anvendtes FL-celle afledt fra humane amnionceller. Resultatet er vist i tabel 1.

TABEL 1

Stamme	Indeholdt plasmid	IFN- (enh./l)
IGC-7	pGC-7	0
IGKA-2	pGKA-2	$1 \times 10^6 - 2 \times 10^8$

Referenceeksempel 1

Konstruktion af en plasmidvektor med trp-promotor:

(a) Rensning af tryptophan-transducerende fag-DNA:

En λ ptrp-fag, λ cI857trpED10 [i det følgende betegnet som λ trp ED, G.F. Miazzari, et al.: J. Bacteriol. 133, 1457 (1978)] blev lysogeneret i Escherichia coli JA 194 stamme [F^- , λ^- , r_k^- , m_k^- , Δ trp E5, leu6, J. Carbon et al.: Recombinant Molecules, side 355 (1977), Raven Press]. Den resulterende lysogene stamme JA 194 (λ trp ED) blev dyrket ved 42 °C i 30 minutter for at induce-

re λ trp ED fager og fremstille λ -fag-lysats. λ -fagerne blev rensat fra λ -fag-lysats ved cæsiumchlorid-ligevægtsdensitetsgradient-centrifugering, som er beskrevet af Yamakawa et al.: "Chemicals of Nucleic Acids I" Tokyo Kagaku Dojin, side 54 - 61, (1974). λ -fagerne blev yderligere rensat ved phenolbehandling og chloroformbehandling ifølge den metode, som er beskrevet af Yamakawa et al.: "Chemicals of Nucleic Acids I" Tokyo Kagaku Dojin, side 62 - 65, (1974).

10 (b) Kloning af trp-promotoren ind i et plasmid:

Kloning af trp-operonet fra λ trp ED fag DNA blev udført på følgende måde. 8 μ g λ trp ED DNA blev nedbrudt ved 37 °C i 2 timer med 16 enheder EcoRI og 16 enheder HindIII i 20 mM "Tris"-HCl (pH 7,5), 75 mM NaCl, 10 mM MgCl₂ og 5 mM dithiothreitol. Separat blev 1 μ g plasmid pBR325 DNA nedbrudt med 2 enheder EcoRI og 2 enheder HindIII ved den samme metode som nævnt ovenfor (slutvolumen: 30 μ l). Reaktionen blev stoppet ved opvarmning til 65 °C i 5 minutter. Derpå blev 15 μ l af hver af nedbrydningsblandingerne blandet, og der tilsattes 500 μ M (slutkoncentration) ATP og 5 enheder T4-DNA-ligase (produkt fra New England Biolabs). Blandingen fik lov at reagere ved 4 °C i 18 timer. Escherichia coli C600 SF-stamme [Cameron et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 3416 (1975)] blev transformeret med plasmidblandingen ved den konventionelle metode [S.N. Cohen et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. 69, 2110 (1972)], og der blev opnået transformanter, som var resistente over for ampicillin (Ap^R), resistente over for tetracyclin (Tc^R) og sensitive over for chloramphenicol (Cm^S). Plasmid-DNA'er blev isoleret fra transformanterne af Escherichia coli og spaltet med EcoRI, HindIII og HpaI. En af plasmid-DNA'erne havde den struktur, som er vist i fig. 4 (A), og blev navngivet pKYP-1.

Et TaqI-spaltningssted findes 4 basepar efter SD-sekvensen (AAGG), som er til stede efter tryptophan-promotoren. Ved udnyttelse af denne kendsgerning blev plasmidet pKYP-1 nedbrudt med TaqI og EcoRI, og nedbrydningsmaterialet blev underkastet rensning ved agarosegelelektroforese til opnåelse af et 2,6 kb DNA-fragment indeholdende tryptophan-promotoren og SD-sekvensen. 2,6 kb DNA-fragmentet blev klonet ind i en kendt vektor, pBR322, ved den metode, som er belyst i fig. 5. 8 μ g pBR322 blev nedbrudt ved 45 °C i 60 minutter med 2 enheder TaqI i 100 μ l af en reaktionsblanding indeholdende 10 mM "Tris"-HCl (pH 8,4), 6 mM MgCl₂, 100 mM NaCl og 6 mM 2-mercaptoethanol. Efter delvis nedbrydning med TaqI blev nedbrydningsmaterialet underkastet gelelektroforese på agarose med lav gелeringstemperatur [Lars Wieslander: Analytical Biochemistry 98, 305 (1979)] til opnåelse af et 4,36 kb rensset DNA-fragment. Omkring 1,5 μ g af DNA-fragmentet blev fuldstændigt nedbrudt ved 37 °C i 3 timer med 3 enheder EcoRI. Ved den samme gelelektroforese på agarose med lav gелeringstemperatur som nævnt ovenfor blev der udvundet ca. 1,0 μ g af et 4,33 kb DNA-fragment. Derpå blev 12 μ g pKYP-1-DNA nedbrudt med 3 enheder TaqI, nedbrydningsmaterialet blev underkastet gelelektroforese på agarose med lav gелerings-temperatur til opnåelse af ca. 2 μ g af et 8,5 kb rensset DNA-fragment, og DNA'en blev fuldstændig nedbrudt med EcoRI ved den samme procedure som ovenfor til opnåelse af ca. 0,5 μ g af et rensset 2,6 kb DNA-fragment. Derpå sættes 0,4 μ g af 4,33 kb DNA-fragmentet fra pBR322 og 0,25 μ g af 2,6 kb DNA-fragmentet fra pKYP-1 til 20 μ l af en reaktionsopløsning indeholdende 20 mM "Tris"-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂ og 10 mM dithiothreitol. Derefter sættes 0,5 mM ATP og 4 enheder T4-DNA-ligase til blandingen, og reaktinen udførtes ved 4 °C i 18 timer. Escherichia coli C600 SF8-stamme blev transformeret med den således opnåede rekombinante plasmid-DNA. Plas-

miderne i transformanten med Ap^R og Tc^R blev isoleret. Plasmid-DNA'en blev nedbrudt med 6 restriktionsendonucleaser, EcoRI, HindIII, ClaI (produkt fra Boehringer Mannheim GmbH), HpaI, HincII og BamHI for at analysere
5 plasmidets struktur. Plasmidet blev erkendt at have den i fig. 4 (B) viste struktur og blev navngivet pKYP-5.

(c) Fremstilling af en overførbare promotor ud fra trp-promotoren:

Den ovennævnte plasmidvektor pKYP-5 er anvendelig som
10 DNA-indførende vektor, da den har et ClaI-sted og et HindIII-sted på DNA'en 1 - 20 basepar efter SD-sekvensen. Imidlertid findes et andet ClaI-sted i pKYP-5-DNA foruden ClaI-stedet umiddelbart efter SD-sekvensen, og det fragment med trp-promotoren, som opnås ved klipning af pKYP-5-
15 DNA med EcoRI og HindIII, er lidt for stort, dvs. 2,65 kb. For at lette anvendelsen blev pKYP-5 forbedret ved den fremgangsmåde, som er belyst i fig. 6, til opnåelse af et plasmid med et DNA-fragment indeholdende en kortere tryptophanpromotor. pKYP-5-DNA blev nedbrudt med
20 HpaII og HindIII, og nedbrydningsmaterialet blev renset til opnåelse af et DNA-fragment på omkring 340 bp. Fragmentet blev indsat i det med ClaI og HindIII nedbrudte pBR322 som belyst i fig. 6 til opnåelse af pKYP-10. Strukturen af pKYP-10 blev bestemt ved nedbrydning med
25 EcoRI, ClaI, HindIII og HpaI og agarosegelelektroforese.

(d) Forbindelse af to eller flere trp-promotorer:

For at konstruere en plasmidvektor med en stærkere promotoraktivitet blev to trp-promotorer indsat i vektoren. Det i trin (c) ovenfor nævnte DNA-fragment på omkring
30 340 bp indeholdende trp-promotoren blev indsat i pKYP-10 nedbrudt med ClaI og HindIII til opnåelse af pKYP-11 som belyst i fig. 7 (A). Den samme procedure blev gent-

get til konstruktion af pKYP-12 som belyst i fig. 7 (B), hvori tre trp-promotorer blev forbundet i den samme orientering. Strukturen af pKYP-12 blev bekræftet ved nedbrydning af EcoRI, ClaI, HindIII og HpaI.

Forsøg 1

Aktivitet af interferon- γ i serum:

Aktiviteterne af interferon- γ -polypeptidet ifølge denne opfindelse (i det følgende betegnet som Gln⁹-IFN- γ) og det interferon- γ -polypeptid, som er beskrevet i EP offentliggørelsesskrift nr. 77 670 (i det følgende betegnet som Lys⁹-IFN- γ), i serum blev undersøgt på følgende måde.

10 μ l af en opløsning indeholdende 100 μ g/ml IFN- γ (Gln⁹-IFN- γ eller Lys⁹-IFN- γ) og 490 μ l humant serum blev blandet, og blandingen blev holdt ved 37 °C i 24 timer. Blandingen blev fortyndet 50 gange med MEM-medium indeholdende 5 % okseserumalbumin, og IFN- γ -aktiviteten (antivirus-aktivitet) blev bestemt ved Armstrongs metode [Armstrong J.A. et al., Appl. Microbiol, 21, 723-725 (1971)]. Som kontrol blev opløsningen indeholdende IFN- γ holdt ved 4 °C i 24 timer og underkastet undersøgelsen. Resultaterne er vist i den følgende tabel.

	<u>Gln⁹-IFN-γ</u>		<u>Lys⁹-IFN-γ</u>	
	Antivirus-aktivitet (enh./ml)	Aktivitetsforhold gennemsnit	Antivirus-aktivitet (enh./ml)	Aktivitetsforhold gennemsnit
Kontrol	200 158,0 149,9	169,3 1,00	193 201,8 241,2	212,1 1,00
Prøvning	284,0 248,3 239,9	254,4 1,50	205,7 234,0 228,8	222,8 1,05

Forsøg 2

Aktivering af IFN- γ ved behandling med trypsin:

45 μ l af hver af to opløsninger indeholdende hhv. 50 μ g/ml Gln⁹-IFN- γ og 50 μ g/ml Lys⁹-IFN- γ blev hver for sig sat til 5 μ l af en trypsinopløsning til fremstilling af blandinger indeholdende trypsin og IFN- γ i vægtforholdene 1:50, 1:100, 1:200 og 1:400. Blandingen blev inkuberet ved 5 °C i 60 min. 2 μ l af blandingen blev sat til 980 μ l MEM-medium indeholdende trypsininhibitor for at stoppe reaktionen. Antivirus-aktiviteten af reaktionsblandingen blev bestemt ved den samme metode som i Forsøg 1. Resultaterne er vist i den følgende tabel.

Forhold trypsin: IFN- γ	Gln ⁹ -IFN- γ		Lys ⁹ -IFN- γ	
	Antivirus- aktivitet (enh./ml)	Aktivitets- forhold	Antivirus- aktivitet (enh./ml)	Aktivitets- forhold
	gennemsnit		gennemsnit	
Kontrol	651,07 539,13 627,10	605,8 1,00	747,66 599,04 493,50	613,4 1,00
1:50	263,37 318,56 296,53	292,8 0,48	604,31 528,99 676,89	603,4 0,98
1:100	1059,30 843,73 760,21	887,7 1,46	633,76 684,30 748,04	688,7 1,12
1:200	1404,19 1388,89 1184,88	1326,0 2,18	1271,8 1214,5 1235,6	1240,6 2,02
1:400	1708,70 1448,74 1501,81	1553,1 2,56	1004,08 1566,84 1356,62	1309,2 2,13

P a t e n t k r a v :

1. Humant interferon- γ -polypeptid, k e n d e t e g n e t ved, at det har den i fig. 3 belyste aminosyre-sekvens.
2. Fremgangsmåde til fremstilling af et humant interferon- γ -polypeptid ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at en mikroorganisme transformeret med et rekombinant plasmid, hvori der er inkorporeret et DNA-fragment, som koder for humant interferon- γ -polypeptid, dyrkes i et næringsmedium, og at det dannede humane interferon- γ -polypeptid udvindes fra dyrkningsmediet.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 2, k e n d e t e g n e t ved, at DNA-fragmentet er inkorporeret efter en tryptophanpromotor.
4. Fremgangsmåde ifølge krav 2 eller 3, k e n d e t e g n e t ved, at mikroorganismen tilhører arten Escherichia coli.
5. Rekombinant plasmid til brug ved fremgangsmåden ifølge krav 2-4, k e n d e t e g n e t ved, at det har inkorporeret et DNA-fragment, som koder for humant interferon- γ -polypeptid ifølge krav 1, efter en tryptophan-promotor.
6. Rekombinant plasmid ifølge krav 5, k e n d e t e g n e t ved, at det er plasmidet pGC-7 eller pGKA-2.
7. Mikroorganisme til brug ved fremgangsmåden ifølge krav 2-4, k e n d e t e g n e t ved, at den indeholder et rekombinant plasmid ifølge krav 5 eller 6.
8. Mikroorganisme ifølge krav 7, k e n d e t e g n e t

ved, at den tilhører arten *Escherichia coli*.

9. *Escherichia coli* IGC-7 (FERM P-6814), (FERM BP-497).

10. *Escherichia coli* IGKA-2 (FERM P-6798), (FERM BP-496).

Fig. 1

DK 160945 B

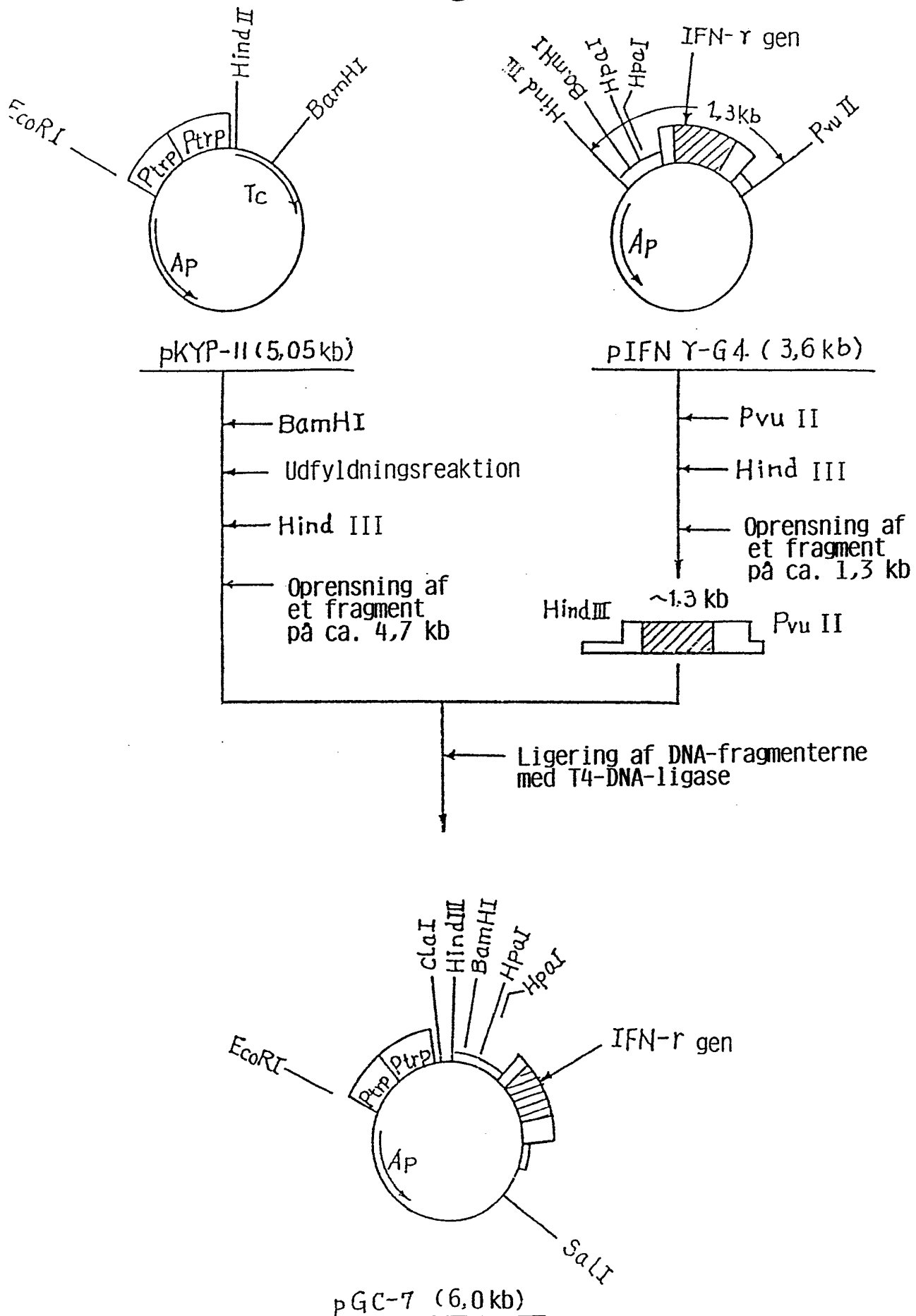
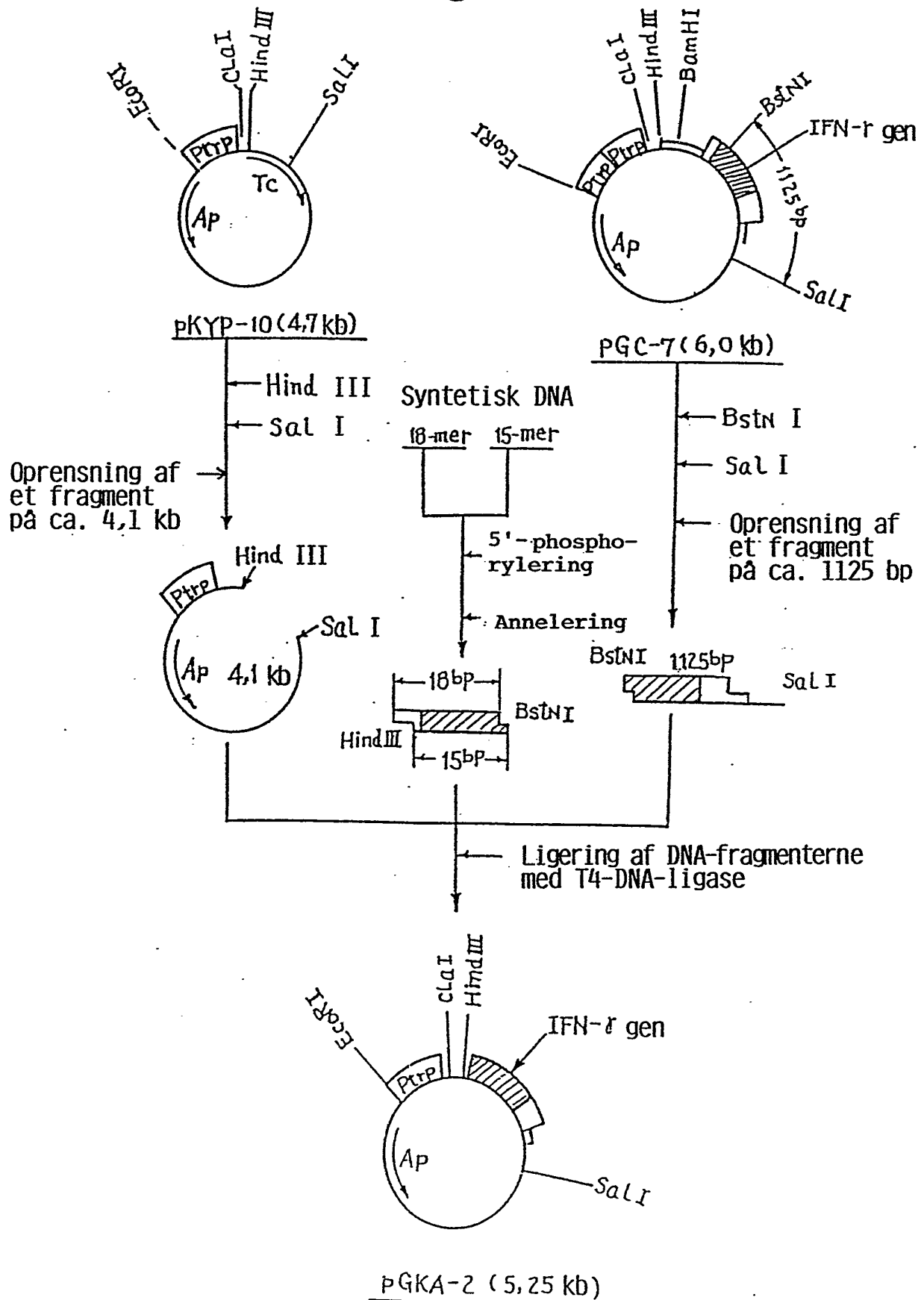


Fig. 2



CACATTGTTCTGATCATCTGAAGATCAGCTATTAGAGAGAAAGATCAGTTAAGTCCTTTGGACCTGATCAGCTTGATACAAAGAAGAACTACTGATT

CAACTTCTTTGGCTTAATTCTCTCGGAAACG ATG AAA TAT ACA TAT tyr thr ser tyr ile leu ala phe gln leu cys ile val leu
met lys tyr thr ser tyr

gly ser leu gly cys tyr cys gln asp pro tyr val gln glu ala glu asn leu lys lys tyr phe asn ala
GGT TCT CTT GGC TGT TAC TGC CAG CAC CCA TAT GTA CAA GAA GCA GAA AAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA

GLY HIS SER ASP VAL ALA ASP ASN GLY THR LEU PHE LEU GLY ILE LEU LYS ASN TRP LYS GLU GLU SER ASP
GGT CAT TCA GAT GTA GCG GAT AAT GGA ACT CTT TTC TTA GGC ATT TTG AAG AAT TGG AAA GAG GAG AGT GAC

ARG LYS ILE MET GLN SER GLN ILE VAL SER PHE TYR PHE LYS LEU PHE LYS ASN PHE LYS ASP ASP GLN SER
AGA AAA ATA ATG CAG AGC CAA ATT GTC TCC TTT TAC TTC AAA CTT TTT AAA GAT GAT GAC CAG AGC

ILE GLN LYS SER VAL GLU THR ILE LYS GLU ASP MET ASN VAL LYS PHE PHE ASN SER ASN LYS LYS ARG
ATC CAA AAG AGT GTG GAG ACC ATC AAG GAA GAC ATG AAT GTC AAG TTT TTC AAT AGC AAC AAA AAG AAA CGA

ASP ASP PHE GLU LYS LEU THR ASN TYR SER VAL THR ASP LEU ASN VAL GLN ARG LYS ALA ILE HIS GLU LEU
GAT GAC TTC GAA AAG CTG ACT AAT TAT TCG GTA ACT GAC TTG AAT GTC CAA CGC AAA GCA ATA CAT GAA CTC

ILE GLN VAL MET ALA GLU LEU SER PRO ALA ALA LYS THR GLY LYS ARG LYS ARG SER GLN MET LEU PHE ARG
ATC CAA GTG ATG GCT GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA ACA GGG AAG CGA AAA AGG AGT CAG ATG CTG TTT CGA

GLY ARG ARG ALA SER GLN
GGT CGA AGA GCA TCC CAG TAA TGGTTGTCCTGCCCTGCAATATTTGAATTTTAAATCTAAATCTATTTATTAATATTAAACATTATTTA

TATGGGGAATATATTTTAGACTCATCAATCAAAATAAGTATTTATAATAGCAACTTTTGTGTAATGAAAATGAATATCTATTAATATATGTATTA

TTTATAATTCCTATATCCTGTGACTGTCTCACTTAATCCTTTGTTTCTGACTAATTAGGCAAGGCTATGTGATTACAAGGCTTTATCTCAGGGG

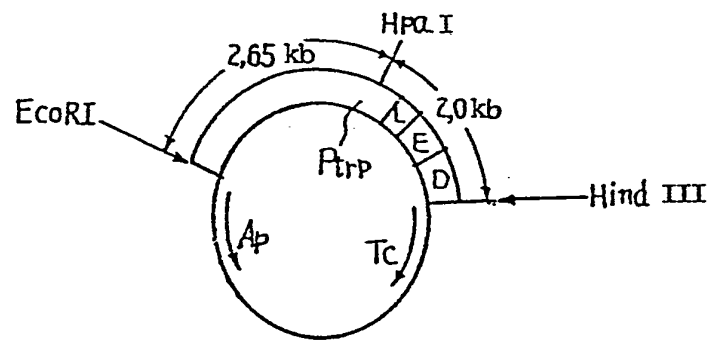
CCAACTAGGCAGCCAAACCTAAGCAAGATCCCATGGGTGTGTGTTTATTTCACCTTGATGATACAAATGAACACTTATAAGTGAAGTGATACTATCC

AGTTACTA CCCCCC''''
↑

Fig. 3

Fig. 4

(A)

pKYP-1 (9,2 kb)

(B)

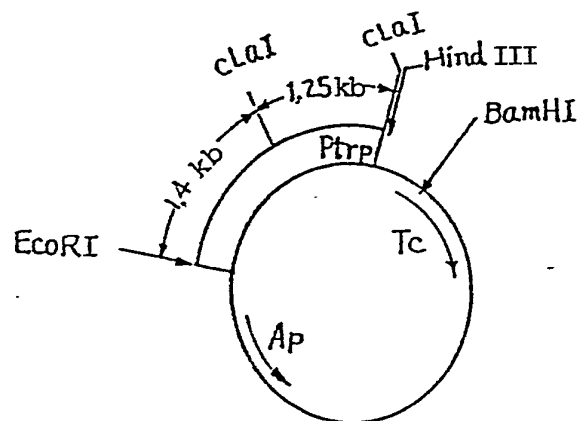
pKYP-5 (5,4 kb)

Fig. 5

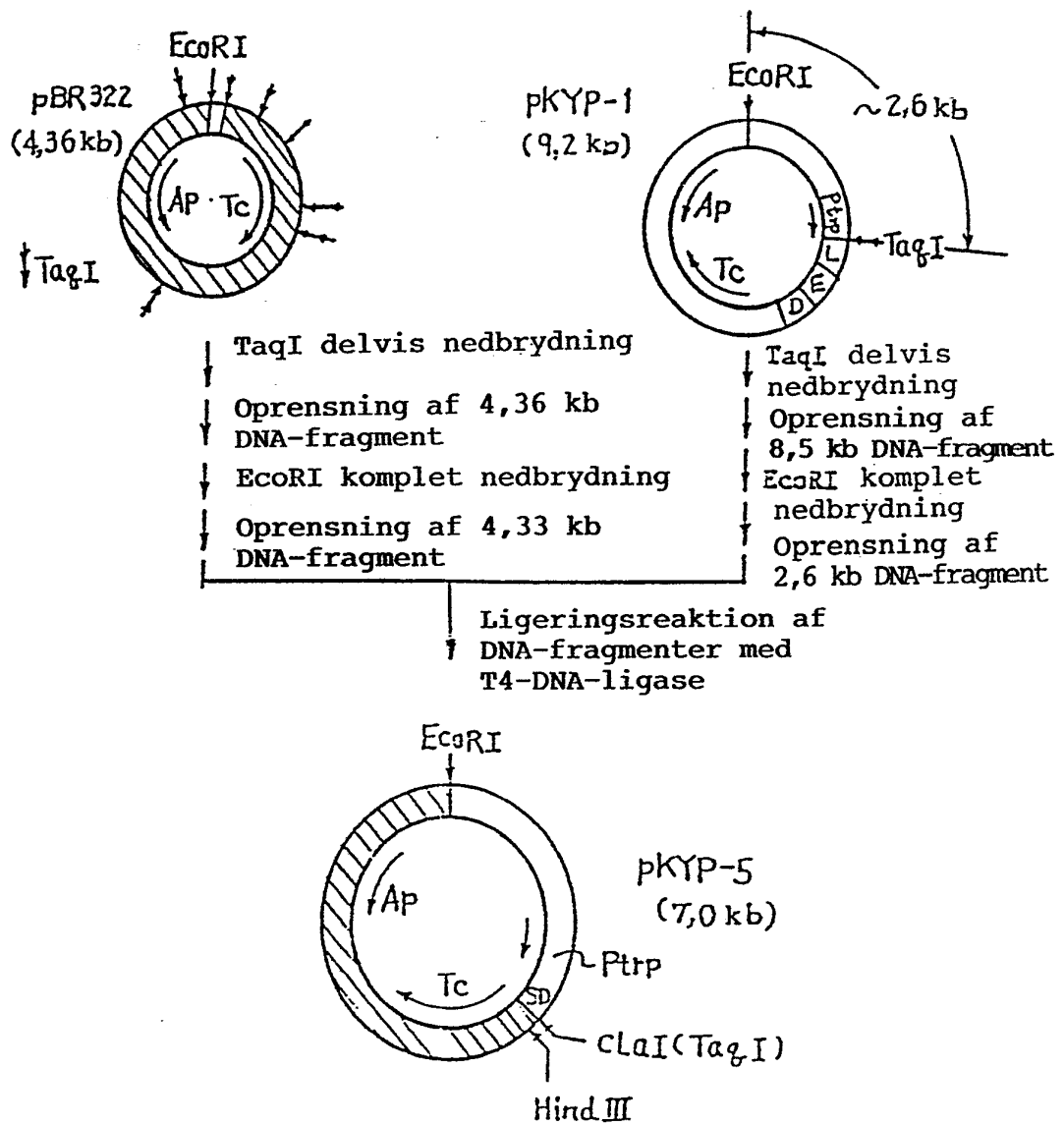


Fig. 6

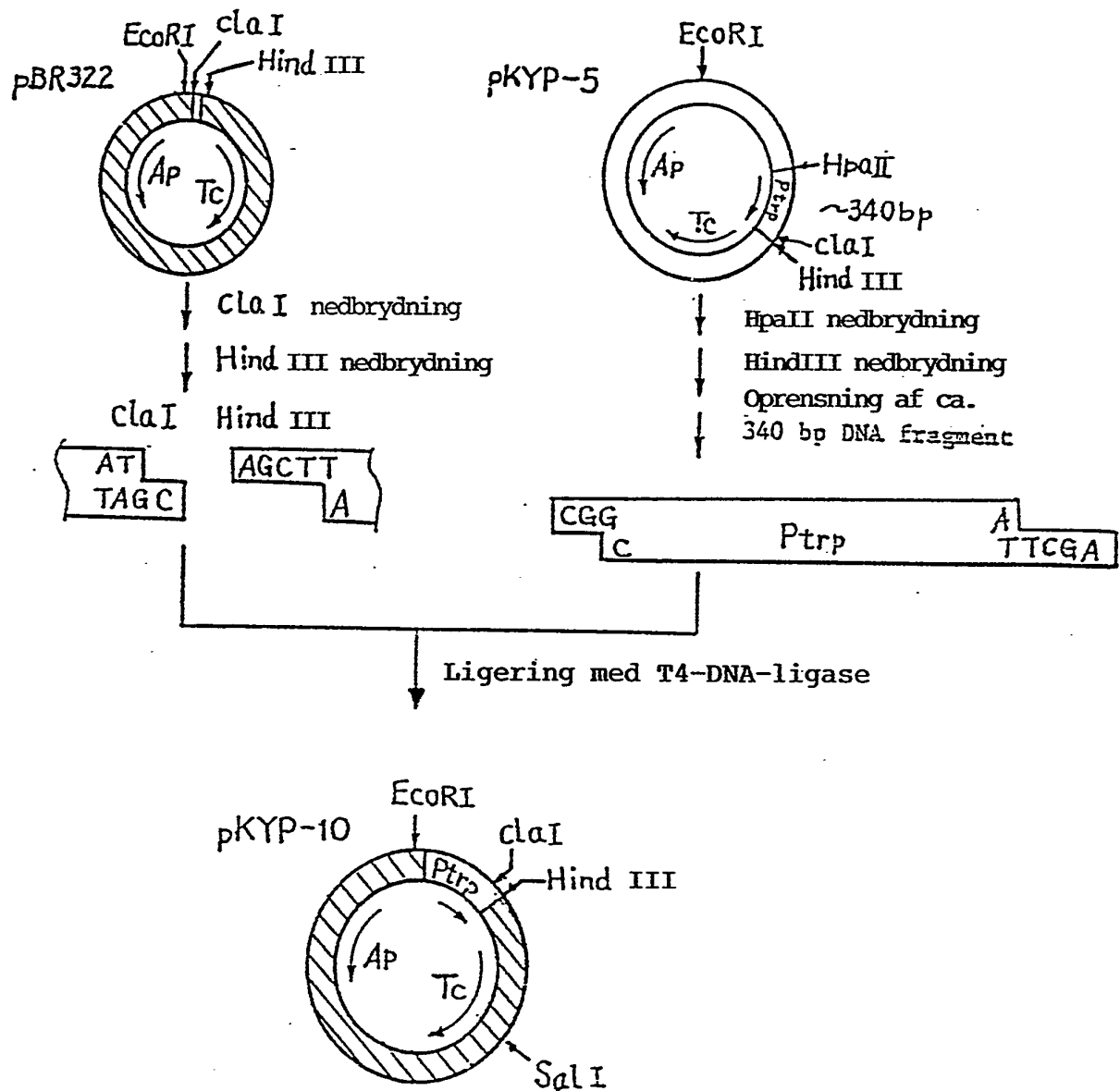
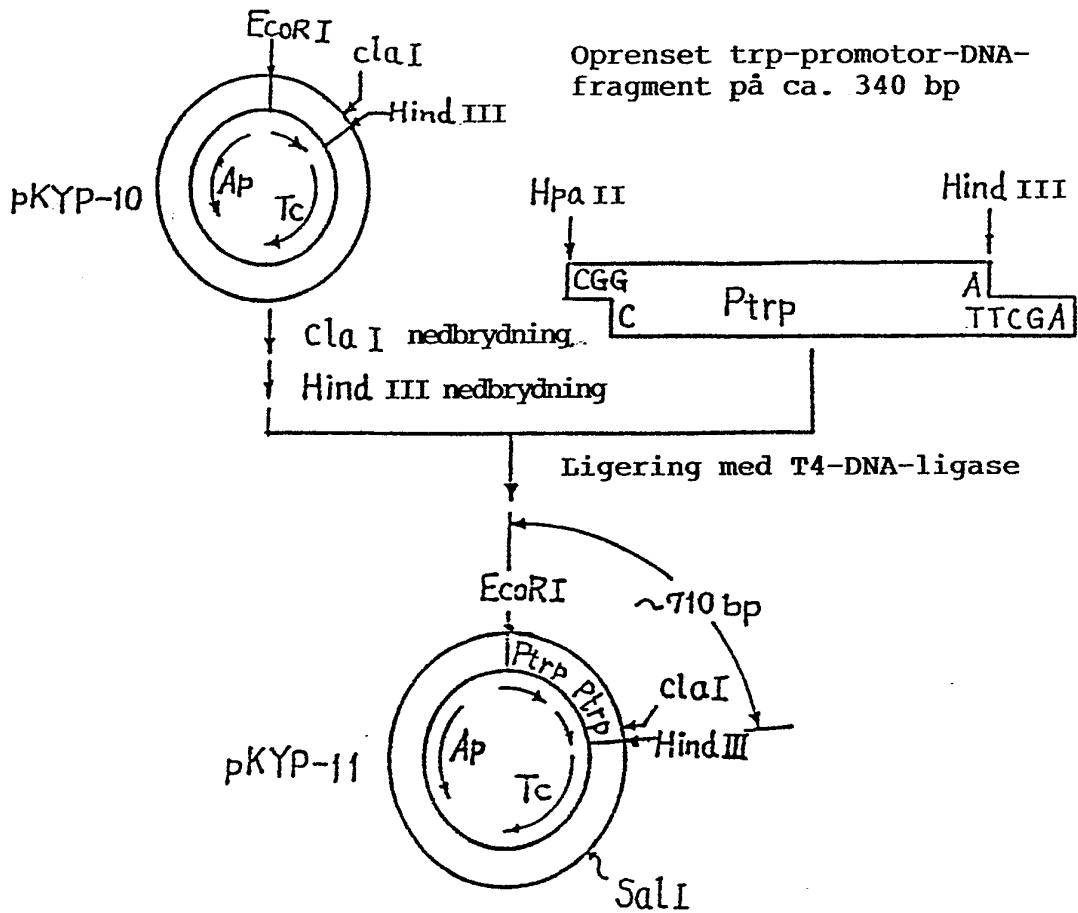


Fig. 7

(A)



(B)

