

(19) HU
**MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG**



**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) (13)
197938 B

(22) A bejelentés napja: 83.12.14. (21) 4263/83

(83) ATCC CRL 8129;
FERM-BP-225;
FERM-BP-226;
FERM-BP-244;
ATCC CRL 8130;
FERM-BP-245;
FERM-BP-246;
FERM-BP-247;
FERM-BP-249.

(33) JP:
EP:

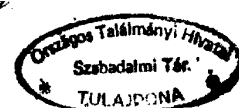
(32) 82.12.15,
82.12.24,
82.12.27,
82.12.29,
83.02.03.

(31) 219518/82,
229619/82,
234607/82,
230371/82,
83101035.0

(41) (42) A közzététel napja: 1984.09.28.

(45) Megjelent: 1990.02.26.

(51) Int.Cl.
C 12 N 15/00;
C 12 P 21/00



(72) Feltalálók:
TANIGUCHI Tadatsugu, Nerima-ku, Tokió,
SUGANO Haruo, Suginami-ku, Tokió, MARA-
MATSU Masami, Tokorozawa-shi, Saitama-
-ken, MATSUI Hiroshi, KASHIMA Nobukazu,
HAMURO Junji, Yokohama-shi, Kanagawa-
-ken, JP

(73) Szabadalmaz:
Ajinomoto Co., Inc., Chuo-ku, Tokió, JP

**(54) ELJÁRÁS INTERLEUKIN-2 POLIPEPTIDET KÓDOLO GÉN,
EZT A GÉNT HORDOZÓ REKOMBINÁNS DNS, A REKOMBINÁNS
DNS-EL RENDELKEZŐ ÉLŐ SEJTVONAL ELŐÁLLÍTÁSÁRA, ÉS
ELJÁRÁS INTERLEUKIN-2 ELŐÁLLÍTÁSÁRA ILYEN SEJTEKKEL**

(57) KIVONAT

Interleukin-2 aktivitással rendelkező poli-
peptidet kódoló gént izolálnak, összekapcsol-
ják egy olyan vektor DNS-sel, amely képes
replikálódni prokarióta vagy eukarióta sej-
tekben (a kapcsolás helye a vektorban a pro-

motor géntől fölfelé levő helynél), és ilyen
módon olyan rekombináns DNS-t nyernek,
amellyel a sejtet transzformálják, és a transz-
formált sejtrel interleukin-2-t termelnek.

A találmány tárgya eljárás interleukin-2 polipeptidet kódoló gén, pontosabban egy klónozott gén, a gént hordozó rekombináns DNS, a rekombináns DNS-sel rendelkező élő sejtvonal előállítására, valamint a sejtvonalat felhasználó módszer interleukin-2 termelésére.

Az interleukin-2 (a továbbiakban „IL-2”), amelyet korábban T sejt növekedési faktorként ismertek, egy oldható fehérje („limfokin” néven is ismeretes), amelyet lektinnel vagy egy antigénnel aktivált T sejtekből nyernek (Morgan, D. A. és munkatársai: Science, **193**, 1007—1008 (1976); Gillis, S. és munkatársai: J. Immunol. **120**, 2027—2033 (1978)). Az interleukin-2 (IL-2) képes módosítani a limfocita reaktivitást és elősegíteni az antigén-fajlagos effektor T-limfociták *in vitro* hosszú ideig tartó tenyésztését (Gillis, S. és munkatársai: Nature **268**, 154—156 (1977)). Az IL-2-ről ismeretes az is, hogy más fontos biológiai aktivitásokat is kifejezésre juttat, mint pl. a timocita mitogenezis fokozása (Chen, B. M. és munkatársai: Cell. Immunol. **22**, 211—224 (1977); Shaw, J. és munkatársai: J. Immunol. **120**, 1967—1973 (1978)), a citotoxikus T sejt reaktivitásának indukálása (Wagner, H. és munkatársai: Nature, **284**, 278—280 (1980)), és anti-SRBC plak-formáló sejt válaszok (Gillis, S. és munkatársai: J. Exp. Med. **149**, 1960—1968 (1979)) csupasz egér lépsejt-tenyészetekben. Következésképpen ez a limfocita-szabályozó anyag hasznos a humorális és sejt immunválaszok lehetővé tételében és az immunhiányos állapotok helyreállításában normális humorális és sejt immunállapotokká. Az IL-2-nek ezek az azonosított immunológiai aktivitásai határozottan jelzik, hogy az IL-2 hasznos az orvosi immunterápiához az immunológiai rendellenességeket ellen, beleértve a neoplasztikus betegségeket, baktérium- és vírus infekciókat, immunhiányos betegségeket, autoimmun-betegségeket, stb. (Papermaster, B. és munkatársai: Adv. Immunopharm., **507**, (1980)). Az interferonokhoz hasonlóan az IL-2-ről kimutatták, hogy fokozza a természetes gyilkos sejt aktivitást, ezáltal lehetséges használata is előtérbe kerülhet a neoplasztikus betegségek kezelésében. Ezen felül az IL-2 képes a funkcionális monoklonális T sejtek tenyésztésének fenntartására és ezért úgy tűnik, hogy kulcsszerepet játszik a T-sejt differenciálódás molekuláris természetének, a differenciált T sejt funkciók mechanizmusának, valamint a T sejt antigénreceptorok mechanizmusának tanulmányozásában. Ez használható még — monoklonális T-sejtek hasszú-idejű tenyésztésével — több más T-sejt eredetű limfokin előállításához, amelyek széles körben alkalmazhatók. Ezen felül az IL-2 termelés és a limfociták IL-2-re adott válasza az immunológiai funkciók fontos paraméterei lehetnek, amelyek hasznosak az abnormális immunitás klinikai diagnózisában.

Az IL-2-t eddig egér, patkány és humán limfocitáknak egy mitogénnel történt stimulá-

lásával állították elő (Gillis, S. és munkatársai: Nature, **268**, 154—156 (1977); Farrar, J. és munkatársai: J. Immunol., **121**, 1353—1360 (1978); Gillis, S. és munkatársai: J. Immunol. **120**, 2027—2033 (1978)), valamint humán perifériás vér mononukleáris limfocitáinak stimulálásával egy mitogénnel (Gillis, S. és munkatársai: J. Immunol. **124**, 1954—1962 (1980)). Gillis és munkatársai számoltak be rágszáló IL-2 készítéséről rágszáló T-sejt limfóma sejtvonalból (Gillis, S. és munkatársai: J. Immunol. **125**, 2570—2578 (1980)) és humán IL-2 előállításáról humán leukémia sejtvonalból.

Gillis és munkatársainak fentebb említett közleményei megvitatják a humán IL-2 termelési módszert mitogén-stimulált humán T-sejt leukémia sejtvonalból sejtenyésztési módszerekkel. Az ilyen technika azonban nem kívánatos kis humán IL-2 koncentrációkat eredményez, és komplex tisztítási eljárásokat is szükségessé tesz, hogy egy kis mennyiségű IL-2-t nyerjünk egy nagy térfogatú tápközegből. Sőt, mivel a humán T-sejt leukémia sejtvonal több más biológiailag aktív vegyület nyomnyi mennyiségeit termeli, amelyek a humán IL-2 analógjai, jelentős nehézségek adódnak az IL-2 izolálásában ezekből az egyéb immunológiailag aktív molekulákból, vagy az IL-2 izolálásában az alkalmanként jelenlevő toxikus lektinekből.

Egy másik megközelítésként kívánatosnak látszik a rekombináns DNS technikák alkalmazása az IL-2 előállításához (DNS a dezoxiribonukleinsav rövidítése), mint ahogyan már használják ezeket más biológiailag aktív humán fehérjék, mint pl. interferonok előállításához (Gray, P. W. és munkatársai: Nature, **295**, 503—508 (1981); Nagata, S. és munkatársai: Nature, **284**, 316—320 (1980); Taniguchi, T. és munkatársai: Gene, **10**, 11—15 (1980)). Mindezeidig azonban az IL-2 előállítását célzó kísérletek rekombináns DNS technikákkal sikertelenek voltak. Így pl. a NIKKEI BIOTECHNOLOGY (Japán) 19. számában (1982. július 5) arról számoltak be, hogy IL-2-t termelő mikroorganizmus alkotását célzó kísérletek rekombináns DNS-sel eredménytelenek voltak, valószínűleg annak a tényezőnek a következtében, hogy az IL-2 polipeptidet kódoló gént még nem klónozták.

Továbbra is fennmaradt tehát az igény egy interleukin-2-t klónozó génre, és egy rekombináns technikával előállított DNS-re, amely a gént hordozza. Fennmaradt az igény egy olyan élő sejtvonalra is, amely magába foglalja a rekombináns technikával előállított DNS-t, és egy olyan módszerre, amelynek segítségével — a sejtvonalat használva — interleukin-2-t lehet előállítani.

A találmányt az alábbiakban röviden a következőképpen foglaljuk össze:

Az IL-2 aktivitásával rendelkező polipeptidet kódoló klónozott gén:

rekombináns technikával előállított DNS, amely az IL-2 aktivitásával rendelkező poli-

peptidet kódoló gént magában foglalja, valamint egy vektor DNS-t is foglal magában, amely képes replikálódni egy prokarióta vagy eukarióta sejtben; az említett gén kódoló szekvenciája a promotor szekvenciától lefelé helyezkedik el.

A jelen találmány prokarióta vagy eukarióta sejtvonalaikat is mutat be, amelyeket a fentebb említett DNS-sel, vektor DNS-sel és kódoló génnel transzformálva IL-2 termelésére tették képessé. A vektor DNS képes replikálódni a sejtben; az említett gén kódoló szekvenciája a promotor szekvenciától lefelé helyezkedik el.

A jelen találmány szerint IL-2 állítható elő olyan eukarióta vagy prokarióta sejtvonalat tartalmazó tápközeg aerob tenyésztésével, amely IL-2 termelése érdekében transzformálva van. A transzformáció egy olyan DNS-sel történik, amely rekombináns technikával módosítva van egyrészt az IL-2 aktivitásával rendelkező polipeptidek előállítását kódoló, találmány szerinti génnel, másrészt egy a sejtben replikálódni képes vektor DNS beiktatásával; az említett gén kódoló szekvenciája a promotor szekvenciától lefelé helyezkedik el.

A találmánynak és előnyeinek sokkal teljesebb felbecsülése válik lehetővé és az egész találmány jobban megérthetővé válik az ezt követő részletes leírásban, ha a kísérő rajzokkal kapcsolatban néhány magyarázatot adunk.

Az 1. ábra az IL-2 aktivitásával rendelkező polipeptid (a továbbiakban ezt „IL-2 polipeptid”-nek nevezzük) termelését kódoló klónozott gén restrikciós endonukleáz hasítási térképét mutatja be.

A 2(a) ábra a klónozott gén bázis-szekvenciáját mutatja be. A 2(b) ábra mutatja be az IL-2 aktivitást mutató polipeptidek I. Aminosav szekvenciáját, II. Aminosav-szekvenciáját és III. Aminosav-szekvenciáját.

A 3. ábra a rekombináns DNS (pCEIL-2) konstrukcióját bemutató folyamatábrára, a rekombináns DNS-be a kódoló gén lett beiktatva.

A 4. ábra a pTrs-3 plazmid vektort mutatja be.

Az 5(a), 5(b) és 5(c) ábrák a pTIL 2—22, pTIL 2—21, pTIL 2—14 és pTIL 2—15 rekombináns DNS-ek konstrukcióját bemutató folyamatábrák, vektorként pTrs-3-at használva.

A 6. ábra a pKIL 2—21 rekombináns DNS konstrukcióját bemutató folyamatábrára, vektorként pKT 218-at használva.

A 7. ábra a pTuIL 2—22 rekombináns DNS konstrukcióját mutatja be folyamatábrában.

A 8. ábra bemutatja azokat a DNS-eket, amelyek képesek replikálódni *Saccharomyces cerevisiae* sejtben.

Az ábrákban az „A”, „G”, „C”, és „T” dezoxiadenilsavat, dezoxiguanilsavat, dezoxicitidil-savat és timidilsavat jelentenek.

A továbbiakban röviden ismertetjük a találmány előnyös megvalósulási módját.

Egy IL-2 polipeptidet kódoló klónozott gént lehet nyerni az IL-2-nek megfelelő (IL-2 mRNS) és IL-2 aktivitással rendelkező polipeptidet előállítani képes emlős sejtből eredő messenger RNS (mRNS, „RNS” a ribonukleinsav rövidítése) átírásával komplementer DNS-sé (cDNS). A nyert egyszálú cDNS (ss-cDNS) átalakítható kettős szálú cDNS-sé (ds-cDNS).

A cDNS előállításához templatként használt mRNS-t hagyományos módon lehet elkülöníteni az IL-2 polipeptid termelésére képes emlős sejtől. Az elkülönített RNS poliadenilált (Gillis és munkatársai: Immunological Rev., **63**, 167—209 (1982)), és a poliadenilált RNS-t frakcionálni lehet pl. szacharóz-sűrűség gradiens centrifugálással, mint 11—12 S üledéket. 13 S mRNS alkalmi előfordulása is mutat mRNS aktivitást, és ilyen esetekben az látszik valószínűnek, hogy ez az mRNS a 11—12 S mRNS egy aggregált formája.

Az IL-2 termelésére képes emlős sejt, amely a jelen találmány szerinti mRNS forrása, lehet T-limfocita, mint pl. perifériás vér mononukleáris sejtek, mandula sejtek, lépsejtek és hasonló, amelyek operációs úton nyerhetők az emlősökből. A sejteket hagyományos módon lehet előkezelni, mint pl. nylon oszloppal, antiszérum-komplementtel, sűrűség-gradiens centrifugálással, többszöri enzimes kezeléssel, mint pl. neuramidináz és galaktóz-oxidáz kombinációja, röntgen-sugár besugárzással vagy tripszinnel, hogy a sejteket felruházzuk IL-2 termelőképesességgel vagy, hogy növeljük az IL-2 aktivitást. T sejt növekedési faktor jelenlétében történt tenyésztés után az említett emlős sejtekből nyert klónozott T limfociták szintén használhatók mRNS forrásként, és ezek az előnyös limfociták. Transzformált limfocita sejtvonalaik, mint pl. leukémia vagy limfóma sejtvonalaiból, vagy a fentebb említett módszerekkel elvégzett mutációval vagy előkezeléssel nyert származékaiból származó T limfociták, vagy a klónozott transzformált sejtvonalaik előnyösek mRNS forrásként. Nyilvánvaló, hogy a klónozott sejtvonalaik általában nagyobb mennyiségű IL-2 mRNS-t tartalmaznak, mint az eredeti sejtvonaltömeg. A fentebb említett sejtekből származó limfociták és tumor sejtvonalaik (pl. CEM, Molt 4 F és BW 5147) egyesítéséből nyert T-sejt hibridómák szintén előnyös sejtvonalaik a találmány szerinti módszerhez. A sejtvonalból származó limfociták között lehetnek olyanok, amelyek (1) konstitutív IL-2 termelők és olyanok, amelyek (2) IL-2-t csak akkor termelnek, ha a tenyészetben kívülről beadagolt mitogén van jelen, vagy ha egyéb IL-2 termelést befolyásoló sejtek vannak jelen, vagy vannak távol.

Abból a célból, hogy IL-2 mRNS-képződést váltsunk ki a konstitutív IL-2 termelő sejtekben, a konstitutív IL-2 termelő sejteket a sejttenyésztés területén általánosan ismert körülmények között tenyésztjük. Az IL-2-t csak mitogén jelenlétében termelő sejtekben

az mRNS képződés kiváltásához a tenyésztett sejteket megfelelő tápközzel mosni kell, majd a megfelelő tápközzel fel kell szuszpendálni, ilyen tápközzel pl. a Rosewell Park Memorial Institute 1640 (a továbbiakban „RPMI 1640”), a Dulbecco Modified Eagle Medium (a továbbiakban „DMEM”) vagy olyan Click-féle tápközzel, amely szérumot tartalmaz vagy nem tartalmaz.

Ezek a tápközzek ki lehetnek egészítve különböző adalékanyagokkal, mint pl. penicillinnel, streptomocinnel vagy más antibiotikumokkal, vagy friss L-glutaminnal, HEPES pufferral és nátrium-bikarbonáttal olyan koncentrációban, amelyet a sejtenyésztés területén általában használnak. Az előnyös sejtsűrűség $0,5-4 \cdot 10^6$ sejt/ml lehet. Az mRNS és az IL-2-előállítás aktiválásának indukálása érdekében megfelelő stimulánsokat adunk hozzá. Ilyen megfelelő stimulánsok lehetnek a mitogének, neuraminidáz, galaktóz-oxidáz, cinkszármazékok, mint pl. cinkklorid, vagy mikroorganizmusokból származó limfocita aktiváló anyagok, pl. „A” fehérje, O-streptolizin. A stimulált sejteket kinyerjük és mossuk. A mitogén-stimulálás folyamán szintén jelenlevő makrofágok vagy dendrites sejtek szintén aktiválhatják az mRNS-t, vagy növelhetik az aktivált mRNS mennyiségét. Hasonlóképpen a B limfocitákból vagy B limfocita vonalakból — mint pl. Raji, Daudi, K 562 és BALL-1 — származó sejtvonalak egyidejű jelenléte aktiválhatja az mRNS-t vagy növelheti az aktivált mRNS mennyiségét.

Az emlős sejtek sokszorozódásának érdekében ezeket *in vitro* sejt-tenyésztésben kell fenntartani, vagy szövettanilag összeférhetően kiválasztott állatokban normál körülmények között. Amikor *in vitro* tenyésztet fenntartását alkalmazzuk az mRNS forrás készítéséhez, a sejteket lehet növeszteni bármilyen olyan tenyésztő tápközzel, amelyről korábban úgy találtuk, hogy elősegítik a T sejtek növekedését. Ezek a tápközzek ki lehetnek egészítve (vagy nincsenek kiegészítve) emlős szérummal, szérumkomponensekkel vagy szérum albuminnal.

Az mRNS aktiválásához szükséges időtartam megfelel annak az időtartamnak, amely a sejtek aktiválásához szükséges, hogy kiváltsák az mRNS képződését. Ez az időtartam általában egybeesik azzal az idővel, amely ahhoz szükséges, hogy az IL-2 kiválasztása a tápközzel meginduljon. Az előnyös időtartam 3–12 óra között lehet a stimuláns, mint pl. egy nitrogén hozzáadása után. A tenyésztési időtartam indokolatlan meghosszabbítása alkalmanként a kialakult mRNS elbomlását eredményezheti. Az IL-2-t termelő sejtek aktiválási folyamata során forbol-észtereket, mint pl. PMA-t vagy TPA-t lehet előnyösen alkalmazni $10-50$ ng/ml koncentrációban, hogy emeljük az aktiválás szintjét.

Az IL-2 mRNS aktiválásának fentebb leírt folyamata $32-38^\circ\text{C}$ hőmérsékleten, párasított

atmoszférában, mintegy $7,0-7,4$ pH értékben hajtható végre.

Azokat az eljárásokat, amelyek az IL-2 termelésére képes emlős sejtek tenyésztéséhez és kinyeréséhez szükségesek, az alábbiakban magyarázzuk el részletesebben.

(1) Konstitutív IL-2 termelő sejtvonalak nyerése

Humán leukémia T-sejt Jurkat-sejtvonalát (amely szabadon beszerezhető a következő helyekről: Fred Hutchinson Cancer Institute, Seattle, Egyesült Államok, Salk Institute, San Diego, Egyesült Államok; Német Rák-központ, Heidelberg, Nyugat-Németország) szuszpendáljuk Click-tápközzel 1×10^6 sejt/ml sejtsűrűséggel és 8×10^3 Röntgensugárral sugározzuk be 150 R/perc besugárzási sebességgel. Ezután az így besugárzott sejtekből $0,1$ sejt/ 200 μl tápközzel koncentrációban 5% FCS-t tartalmazó Click-tápközzel inokulálunk 96 üreges laposfenekű mikrolemezben (Falcon 3072) és 3 héten át tenyésztjük 37°C hőmérsékleten 5% széndioxidot tartalmazó inkubátorban (klónozás korlátozott hígítási módszerrel). A kinőtt elő sejteket átvisszük 24 üreges tenyésztő lemezre (Nunc), még mielőtt a sejt-réteg egybefolyóvá válna, majd további 5 napig tenyésztjük. A kinőtt sejteket tovább tenyésztjük szérumban és szérum-albumin mentes szintetikus tápközzel mintegy két napig $1-2 \times 10^6$ /ml kezdeti sejtsűrűséggel. A tenyésztet felülúszóját centrifugálással kinyerjük, és $0,22$ millipórusú szűrőpapíron átszűrjük, hogy az üledéktől megtisztítsuk és a felülúszót sterilizzuk, majd a konstitutíven IL-2 termelésre képes, Röntgensugárral kezelt mutánsokat kiválasztjuk és klónozzuk a felülúszóban mért IL-2 aktivitás mérése alapján.

(2) IL-2 termelő sejt kinyerése humán perifériás vér mononukleáris sejtekből.

Humán perifériás vért nyerünk ki és perifériás vér limfocitákat (a továbbiakban „PBL”) izolálunk sűrűség gradiens centrifugálással Ficoll-Hypaque-on. A PBL-t 2 ml 5% FCS-t tartalmazó Click tápközzel 2 ml-ében inokuláljuk 1×10^6 /ml sejtsűrűséggel 24 üreges Nunc tenyésztő lemezen 100 μl 5 mg/ml-es fithemagglutinin M-el (Gibco) (PHA) együtt, és 48 órán át tenyésztjük a fentebb leírt körülmények között. A sejteket mossuk és ismét inokuláljuk 1 ml Click tápközzel 1×10^5 ml sejtsűrűséggel 1 ml „kondicionált” tápközzel együtt — amely tápközzel olyan humán splenocitákból készült, amelyeket $2,5$ μg /ml concanavalin A-val („Con A”) stimuláltak 48 órán át —, majd az 50% „kondicionált” tápközzel tartalmazó tápközzel három naponként cseréljük, hogy a PBL-ből humán T limfociták hosszú idejű tenyésztését nyerjük. Az így készített hosszú ideig tenyésztett humán T limfocitákat klónozzuk a fentebb leírt korlátozott hígítási módszerrel humán splenocita eredetű „kondicionált” tápközzel jelenlétében és a sejt klónokat hasonlóképpen sokszorozzuk. Ezután a klónozott humán T lim-

focitákat inokuláljuk 1 ml RPMI 1640-ben 1×10^6 /ml sejt-sűrűséggel 24 üreges Nunc tenyésztő lemezen 10 μ g/ml PHA jelenlétében és 24 órán át tenyésztjük 37°C hőmérsékleten 7,5% CO₂-inkubátorban. A tenyészet felülűsóját kinyerjük, centrifugáljuk, 0,22 μ millipórusú szűrőn átszűrjük és IL-2 aktivitásra megvizsgáljuk, hogy pontosan meghatározzuk az IL-2 termelő normál humán T-limfocita klónokat.

(3) Mitogén jelenlétében IL-2-t termelni képes humán limfocitákból származó rosszindulatú sejtvonal nyérése

Jurkat sejtvonal, vagy klónozott sejtvonalak, mint pl. Jurkat III, amelyet a fentebb leírt korlátozott hígítási módszerrel nyertünk, képesek 10–4 000 egység/ml IL-2-t előállítani, amikor 24 órán át tenyésztjük a korábban leírt szérumszintetikus tápközegben vagy 1–2% emlős szérumot tartalmazó RPMI-1640-en, mitogén, mint pl. 10 μ g/ml Con A vagy 2,5 μ g/ml PHA jelenlétében. Ezek a rosszindulatú humán sejtvonalak termelnek IL-2-t akkor is, amikor cink-klorid, „A” fehérje vagy picibanil jelenlétében tenyésztjük.

(4) Mitogén, más stimuláló sejtek vagy stimuláló oldható faktorok együttes jelenlétében IL-2-t termelni képes sejtek nyérése

Molt 4 F humán rosszindulatú sejtvonal és bizonyos klónozott sejtvonalak, mint pl. Jurkat J 99 — amelyet a korlátozott hígítási módszerrel nyertünk — nem termelnek IL-2-t még akkor sem, ha 24–72 órán át lektin vagy mitogének bármilyen koncentrációja jelenlétében tenyésztjük. Ugyanakkor ezek a sejtek képessé válnak jelentős mennyiségű (10–100 E/ml) IL-2-t termelni 24 órás tenyésztési időköz alatt 37°C hőmérsékleten, ha együtt tenyésztjük 5–10 E/ml interleukin I-el (a monokinek egyikével), vagy K 562 vagy Raji sejtek 50%-ot kitevő mennyiségével.

Az IL-2 mRNS kivonását a fentebb említett módon aktivált sejtekből a hagyományos, jól ismert módszerrel végezzük, tekintet nélkül a sejtek különböző forrásaira. Így pl. a sejteket részben vagy teljesen felaprítjuk detergens, pl. NP-40, SDS, Triton X és dezoxi-kólsav hozzáadásával vagy mechanikai homogenizálással vagy a fagyasztás-felengedtetés módszerével. Hogy az mRNS kivonása folyamán az RNS ribonukleáz által okozott bomlását megakadályozzuk, előnyös RN-áz inhibitorokat, mint pl. heparint, polivinil-szulfátot, bentonitot, makaloidot (forgalmazza: National Lead Company, Houston, Texas) dietil-pirokarbonátot vagy vanadil-komplexet hozzáadni. Az IL-2 mRNS-t az IL-2 bioszintézisben kicsapott poliszómából nyerhetjük, amely anti-IL-2 antitesttel van kicsapva egy detergenssel kivonva.

A poli A-t tartalmazó mRNS-t bármilyen hagyományos módszerrel lehet frakcionálni vagy koncentrálni, így pl. affinitás-kromatográfiával, vagy oligo-dT cellulózon vagy sepha-

rose 2 B poli-U-sepharózan történő egytételi abszorpcióval, szacharóz sűrűség gradiens centrifugálással vagy agaróz gél elektroforézissel.

5 Az mRNS frakciókat ezután levizsgáljuk IL-2 mRNS aktivitásra az mRNS frakciókból átirított fehérjék biológiai aktivitásának ki-
10 próbálásával vagy az átirított fehérjék azonosításával, az IL-2 peptid elleni morfiklonális antitestet alkalmazva. Így pl. az mRNS általában a megfelelő fehérjévé íródik át, béka (*Xenopus laevis*) petébe történő mikroinjekcióval (Gurdon, J. B. és munkatársai: *Nature* 233, 177–182 (1972)), vagy az mRNS-től
15 függő retikulizátumnak vagy gabonacsíra transzlációs, sejtmentes rendszerének alkalmazásával.

Az IL-2 aktivitást lehet bizonyítani mikrovizsgáló módszerrel, amelyet elvileg Gillis és munkatársai (Gillis, S. és munkatársai: *J. Immunol.*, 120, 2027–2033 (1978)) dolgoztak ki. A vizsgálat figyeli a citotoxikus T limfocita sejtvonalak (CTLL) IL-2 függő celluláris
20 sejtburjánzását, a sejtvonalak Gillis és munkatársai által leírt módszer szerint vannak kiváltva. Azaz 4×10^3 CTLL sejtet inokulálunk 2% FCS-t tartalmazó 100 μ l RPMI 1640 tápközegbe 96 üreges laposfenekű mikrolemezben 100 μ l sorozatban hígított átirított
25 termékkel együtt. 20 óra inkubálás után 37°C hőmérsékleten 5% CO₂ inkubátorban a sejteket 4 órán át rázatjuk 0,5 μ Ci ³H-TdR-rel, üvegszál-csíkokra gyűjtjük ki egy automatikus sejt-kinyerő segítségével, majd a beépült
30 aktivitást folyadék scintillációs számlálóval mérjük. Ezekkel a vizsgáló eljárásokkal az IL-2 jelenlétében tenyésztett CTLL sejtekről úgy találjuk, hogy a ³H-TdR dózis-függő módon beépül, a vizsgálati mintában levő IL-2
35 mennyiségének határozott kiszámítását téve lehetővé.

Az IL-2 olyan aktivitással rendelkezik, amely a T-limfociták burjánzását elősegíti, ez lehetővé teszi az IL-2 aktivitás mérését
45 T-sejt növekedési aktivitási indexet alkalmazva. Azaz 5 CTLL sejtet viszünk át 100 μ l 2% FCS-t tartalmazó DMEM-be 96 üreges laposfenekű mikrolemezekben 100 μ l szériahígítási
50 átírási (transzlációs) termékkel együtt. 72–96 órás inkubálás után 37°C hőmérsékleten 5% CO₂ inkubátorban, a kinőtt sejtek és aktivált sejtek számát mikroszkóp alatt megszámláljuk. Pozitív külső kontroll csoportként 100 egység/ml és 10 egység/ml
55 IL-2-t adunk és a vizsgálati minta IL-2 aktivitását kiszámítjuk, összehasonlítva a kinőtt élő sejtek számával ezekben a kontroll csoportokban.

60 A legaktívabb frakciókból így nyert IL-2 mRNS szolgál templatként a ds-cDNS szintéziséhez és a ds-cDNS kapcsolódik egy vektor DNS-sel. A cDNS szintézisét hagyományos módszerekkel hajtják végre.

65 Először ss-cDNS, amely az mRNS-sel komplementer, készül el dATP, dGTP, dCTP,

dTTP jelenlétében, reverz transzkriptázt alkalmazva és mRNS-t használva templátként, és az oligo-dT-t leolvasó mintaként (primerként). A templát mRNS-t azután alkálikus kezeléssel eltávolítjuk és a ds-cDNS-t reverz transzkriptáz vagy DNS polimeráz alkalmazásával hozzuk létre, a fentebb szintetizált ss-cDNS-t használva templátként.

A rekombináns technikával előállított DNS-t az így nyert ds-cDNS-ből és egy replikont tartalmazó vektor DNS-ből — amely replikon képes replikálódni eukarióta vagy prokarióta rendszerekben — készítjük. A rekombináns DNS-t ezután beépítjük a gazdaszejtbe.

A ds-cDNS és egy vektor DNS, amely képes az eukarióta vagy prokarióta sejtekben sokszorozódni, a kapcsolás előtt módosítva vannak különböző eljárásokkal mint pl. exonukleáz kezelés, kémiai szintetikus DNS darabok valamint G, C végződés hozzáadása kapcsolható terminálist adva a ds-cDNS és a vektor DNS végeinél. A kapcsolható DNS-ek kapcsolását végre lehet hajtani pl. T₄-fág DNS ligáz segítségével ATP jelenlétében.

Az így nyert rekombináns DNS-sel élő sejteket lehet transzformálni a klónozott cDNS kibővítésére vagy IL-2 polipeptid termelésére.

Megfelelő eukarióta gazda-organizmusok, amelyeket általában IL-2 termelésére használnak, lehetnek gerincesek, élesztők stb. Így pl. majom-sejteket, (pl. CV-1 sejt), amelyeket SV-40 eredetű defektív mutánsal transzformáltak és amely az SV-40 nagy T antigénjét (COS sejtek) fejezi ki, amint ezt Y. Gluzman részletezte (Cell, 23, 175—182 (1981)); egéreredetű sejteket, amelyeket Ohno, S. és Taniguchi, T. írtak le (Nucleic Acids Research, 10, 967—977 (1982)); és élesztő gazda-vektor rendszereket, amelyeket az IFN gén kifejezéséhez alkalmaznak, és amelyet R. Hitzeman írt le (Nature, 293, 717—722 (1981)), lehet használni. Megfelelő prokarióta gazda-organizmusok lehetnek *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, stb. A DNS sokszorozása érdekében a gazdaszervezetben előnyös az *E. coli*-t alkalmazni gazdaszervezetként, bár más gazdaszervezetek is alkalmazhatók.

Az *E. coli*-hoz használt alkalmas vektorok lehetnek EK típusú plazmid vektorok (szigorú típus): pSC101, pRK353, pRK646, pRK248, pDF41, stb; EK típusú plazmid vektorok (mésélt típus): ColE1, pVH51, pAC105, RSF 2124, pCR1, pMB9, pBR313, pBR322, pBR324, pBR325, pBR327, pBR328, pKY2289, pKY2700, pKN80, pKC7, pKB158, pMK2004, pACYC1, pACY184, dul, stb; λ gt típusú fág vektorok λ gt.λc, λ gt.λB, λWES, λC, λB, λzj vir., λB', λALO, λB, λWES.Ts622, λDam, stb. Általában a pBR322-t használják leggyakrabban vektorként *E. coli*-hoz és ebben az esetben a legjobb klónozó helyek a PstI és az EcoRI helyek.

6

A gazdaszejt transzformálását a rekombináns DNS-sel hagyományos úton lehet végrehajtani a következőképpen.

Ahol a gazdaszervezet prokarióta, mint pl. az *E. coli*, olyan megfelelő sejteket készítünk, amelyek képesek a DNS befogására. Ezeket a sejteket olyan sejtekből készítjük, amelyeket az exponenciális növekedési fázis után nyelünk és ezt követően CaCl₂-módszerrel, ismert eljárás szerint kezelünk. Amikor MgCl₂ vagy RbCl van a transzformációs reakcióközegben, a transzformáció határfoka nő. A transzformációt a gazdaszejtből történt protoplaszt-képzés után is végrehajthatjuk.

Ahol az alkalmazott gazdaszervezet eukarióta, a DNS transzfekciós módszerét, mint pl. kalcium-íószfátos kicsapást, hagyományos mechanikus módszereket, mint pl. mikroinjekciót, a vörös vörsejt gazdaszervezetben vagy liposzómákban bezárt plazmid beiktatását, a sejtek kezelését valamilyen ágenssel, mint pl. lizofoszfadil-kolinnal, vagy vírus vektorok alkalmazását és más hasonló módszereket lehet használni.

Az IL-2 génnel rendelkező sejtek izolálása a transzformáció után az alábbi két módszer egyikével történhet:

(1) A plusz-mínusz módszerben, részlegesen tisztított IL-2 mRNS-t nyerünk a mitogénnel aktivált emlős sejtekből extrahált mRNS-ek szacharóz gradiens centrifugálásával, mint 11—12S üledékeket, majd 32 P-radioaktívan jelzett ss-cDNS-t szintetizálunk a részlegesen tisztított mRNS-t használva templátként. A templát mRNS alkálikus kezeléssel történő eltávolítása után az izolált cDNS-t hidroxilapatit-oszlopkromatográfiával frakcionáljuk. A nem hibridizált cDNS-t és a hibridizált cDNS-t ideiglenesen „A” mintának, illetve „B” mintának nevezzük. A transzformánsok a két nitrocellulóz szűrőn teljesen azonos módon nőnek, és a sejtek DNS-e a szűrőpapíron alkálikus kezeléssel rögződik. Az „A” mintát és a „B” mintát hibridizáljuk a DNS-sel két különböző szűrőpapíron, majd autoradiográfiás mérést hajtunk végre, hogy kiválasszuk azokat a transzformánsokat, amelyek pozitívan reagálnak az „A” mintával (plusz), de gyengén vagy egyáltalán nem reagálnak a „B” mintával (mínusz) (Taniguchi és munkatársai: Proc. Jpn. Acad., v 155B 464—469 (1979)).

(2) A második módszer pl. 1000—10000 transzformáns klón szétosztásából áll több tíz vagy több száz klón csoportba. A szétosztott klón csoportokat egymás után tenyésztjük hagyományos módon, hogy plazmid DNS-t nyerjünk. Ezután ezeket a plazmid DNS-eket átalakítjuk ss-cDNS-ekké, pl. hődenaturálással, és a nyert ss-cDNS-eket nitrocellulóz szűrőpapíron rögzítjük, hogy a rögzített DNS-re komplementer és aktivált IL-2 mRNS-t magába foglaló emlős sejtekből készült mRNS hibridizálását elérjük. Egy másik módszer szerint IL-2 mRNS-t tartalmazó mRNS-t hib-

ridizálunk hődenaturált plazmid DNS-sel, majd a DNS-mRNS hibridet rögzítjük a nitrocellulóz szűrőpapírra. Ezeket a szűrőpapírokat azután kis sókoncentrációjú pufferekkel, mint pl. 1 mmól/literes HEPES puffer, vagy 10 mmól/literes NaCl, mossuk, és a szűrőpapíron adszorbeált mRNS-t extraháljuk mintegy 1 percig 95°C hőmérsékleten a következő oldattal: 0,5 mmól/l EDTA, 0,1% SDS. A tisztított mRNS-t oligo dT-cellulóz oszlopkromatográfiás elúcióval történő elúcióval nyerjük ki. Ezután az mRNS-t fehérjébe fordítjuk le, *Xenopus laevis* petébe történő mikroinjektálással az IL-2 aktivitás meghatározása érdekében, vagy az mRNS-t egy fehérjébe fordítjuk le mRNS-függő reticulocita vagy búzacsíra *in vitro* sejtmentes transzlációs (lefordító) rendszert alkalmazva, az IL-2 aktivitás analízise érdekében anti-IL-2 antitestet alkalmazva. Ezek szerint az eljárások szerint az a csoport, amelyben az IL-2 aktivitás kimutatható, ismételtén tovább osztható kisebb számú transzformáns klónokat tartalmazó csoportokba, amíg egy egyedi, IL-2 DNS-sel rendelkező klón marad.

Hogy az IL-2 termelő transzformánsokból IL-2 polipeptidet kódoló cDNS-t nyerjünk, a transzformánsban levő rekombináns DNS-t elkülönítjük és restrikciós endonukleázzal elhasítjuk. A hasítással képződött DNS fragmentsekből a beiktatott cDNS frakciókat elkülönítjük.

pIL2-50A rekombináns DNS-ből nyert, IL-2 polipeptidet kódoló Pst I DNS-beiktatott rész(inzert) teljes nukleotid szekvenciáját Maxam és Gilbert (Meth. Enzym. **65**, 499—560 (1980)) módszerével és a didezoxinukleotid lánc végződési módszerrel (Smith, A. J. M.: Meth. Enzym. **65**, 560—580 (1980)) határozzuk meg.

A cDNS inzert restrikciós endonukleáz hasítási térképét és az inzert bázis-szekvenciáját az 1. ábra és a 2(a) ábra mutatja, amelyekben a cDNS BstNI, XbaI és BstNI (ebben a sorrendben) restrikciós endonukleázokkal hasított helyekkel bír.

Az inzert DNS szekvenciája egy egyedi nagy nyitott leolvasó keretet tartalmaz. Az első ATG szekvencia, amely általában induló szekvenciaként szolgál eukariótákban (Kozak, M.: Cell, **15**, 1109—1123 (1978)), a 48—50 nukleotidnál található az 5' végtől. Ezt az ATG-t követi 152 kodon, mielőtt a TGA befejező triplettal találkozunk az 507—509 nukleotidoknál.

Az mRNS 3'-poli(A)-végződésének megfelelő A-gyökök egy szakaszát találjuk a cDNS végénél és ezt előzi meg az AATAAA hexanukleotid (771—766 hely), amelyet általában meg lehet találni a legtöbb eukarióta mRNS-ben (Proudfoot, N. J. és Brownlee, C. G.: Nature, **263**, 211—214 (1976)).

Az aminosav-szekvenciát, amelyet a cDNS kódol, le lehet vezetni a 2(b) ábra alapján (1 Aminosav-szekvencia), és az 1 aminosav

szekvencia polipeptidje 153 aminosavat tartalmaz és molekulatömege 17631,7 daltonnak van kalkulálva. Amint ezt leírták az eddig ismert szekréciós fehérjék legtöbbjében közös vonásként (Blobel, G. és munkatársai: Sym. Soc. exp. Med., **33**, 9—36 (1979)), a levezetett IL-2 polipeptid N-terminális területe szintén meglehetősen hidrofób és ez a terület valószínűleg szignál peptidként szolgál, amely az érett IL-2 kiválasztási folyamata során lehasad. Ilyen lehasadás történik vagy Ser és Ala között a 20. és 21. helyzeteknél, illetve Ala és Pro között a 21. és 22. helyzeteknél, olyan polipeptidet képezve, amely II és III aminosav szekvenciával bír, mivel hasonló hasítási helyeket gyakran találtak más szekréciós fehérjéknél (Blobel, G. és munkatársai: Symp. Soc. exp. Med. **33**, 9—36 (1979)). Az érett IL-2 polipeptid azután 132 vagy 133 aminosavat tartalmaz 15420,5 dalton vagy 15349,4 dalton kalkulált molekulatömeggel. Ezt az értéket azután összehasonlítjuk a Jurkat sejtekből nyert humán IL-2 fehérjéről leírt értékekkel (15000 dalton) (Gillis, S. és munkatársai: Immunological Rev., **63**, 67—209, (1982)). Ezen kívül, a bázis szekvenciában 111—113 helyzetnél levő CCT kodontól induló DNS fragmensről, amely ennél fogva a Pro-nál, 22. helyzetnél induló polipeptidet kódolja (III Aminosav-szekvencia, 2(b) ábra), bebizonyosodott, hogy olyan polipeptidet fejez ki, amely IL-2 aktivitással rendelkezik, amint ez az 5. példában be lesz mutatva. Szintén bizonyítást nyert, hogy a bázis szekvenciában 107.—110. helyzeteknél levő GCA szekvenciával induló DNS fragmens, amely ennél fogva a 21. helyzetnél levő Ala-nál induló polipeptidet kódolja (II. Aminosav-szekvencia a 2(b) ábrában), olyan polipeptidet fejez ki, amely IL-2 aktivitással rendelkezik, amint ezt a 8. példában majd bemutatjuk.

Ismeretes, hogy eukarióták génjei gyakran mutatnak polimorfizmust pl. humán interferon géneknél. (Taniguchi és munkatársai: Gene, **10**, 11—15 (1980); Ohno és Taniguchi: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **77**, 5305—5309 (1980); Gray és munkatársai: Nature, **295**, 501—508 (1981)). Bizonyos esetekben a polimorfizmus társul a fehérjetermék bizonyos aminosavainak helyettesítésével, más esetekben viszont a fehérje szerkezete változatlan marad. Humán IL-2 cDNS esetében egy másik cDNS klónt (pIL2—503), amelyben az „A” maradékot a pIL-50A cDNS 503. helyzeténél (2. ábra) egy „G” maradék helyettesíti, lehet észlelni. Más cDNS klónok bizonyos bázis-helyettesítésekkel a pIL2—50A cDNS-hez viszonyítva szintén várhatók.

Amint az a fentiekből megérthető, a jelen találmány szerinti génnek lehetnek: a 2(a) ábrában bemutatott bázis-szekvenciával rendelkező DNS; a 48—50 helyzeteknél ATG szekvenciával kezdődő DNS-ek, amelyek az ATG szekvenciát követő, legalább az 504—506 helyzetnél levő ATG szekvenciáig tartó bázis-

szekvenciával rendelkeznek; a 108—110 helyzeteknél GCA szekvenciával kezdődő DNS-ek, amelyek a GCA szekvenciát követő, legalább az ATC kodonig tartó bázisszekvenciával rendelkeznek; és a 111—113 helyzeteknél CCT szekvenciával kezdődő DNS-ek, amelyek a CCT szekvenciát követő, legalább az ACT szekvenciáig tartó bázisszekvenciával rendelkeznek.

A jelen találmány szerinti gének lehetnek még olyan DNS-ek, amelyek az ACT szekvenciával végződnek az 504.—506. helyzeteknél és A-val kezdődnek az I. helyzetnél, ATG a szekvenciájuk a 48.—50. helyzetnél, GCA a szekvenciájuk a 108.—110. helyzetnél vagy CCT a szekvenciájuk a 111—113. helyzetnél. A jelen találmány szerinti gének továbbá lehetnek olyan DNS-ek, amelyek TGA szekvenciával végződnek a 507.—509. helyzetnél és A-val kezdődnek az I. helyzetnél, ATG a szekvenciájuk a 48.—50. helyzetnél, GCA a szekvenciájuk a 108.—110. helyzetnél vagy CCT a szekvenciájuk a 111.—113. helyzetnél. A jelen találmány szerinti gének továbbá olyan DNS-ek, amelyek C-vel végződnek a 801. helyzetnél és A-val kezdődnek az I. helyzetnél, ATG a szekvenciájuk a 48.—50. helyzetnél, GCA a szekvenciájuk a 108.—110. helyzetnél vagy CCT a szekvenciájuk a 111.—113. helyzetnél. A jelen találmány szerinti gének ezen felül lehetnek olyan DNS-ek, amelyek poli(A)-val végződnek és ATG kodonnal indulnak a 48.—50. helyzetben, GCA a szekvenciájuk a 108.—110. helyzetben vagy CCT a szekvenciájuk a 111.—113. helyzetben.

A jelen találmány szerinti gének lehetnek olyanok, amelyek bázis szekvenciája megfelel az I, II és III. Aminosav-szekvenciáknak. Ezen túl olyan polipeptidek is rendelkezhetnek IL-2 aktivitással, amelyekben az I. Aminosav-szekvencia egy vagy több aminosava hiányzik, vagy olyan polipeptidek, amelyekben az I. Aminosav-szekvencia egy vagy több aminosava helyettesítve van egy vagy több aminosavval. Ennél fogva azok a gének, amelyek ilyen polipeptideket kódolnak, szintén a jelen találmánynak megfelelő gének. Hasonlóképpen azok a gének, amelyek többlet kapcsolattal rendelkeznek egy vagy több olyan bázis-szekvenciához, amely képes kifejezni egy vagy több többlet-aminosavat az I, II vagy III. Aminosav-szekvenciához, szintén megfelelnek ennek a találmánynak mindaddig, amíg a többlet hozzátett aminosavak nem zavarják a polipeptidek tevékenységét az IL-2 aktivitás kifejtésében. A módosított kapcsolt többlet-aminosav terület, amely zavarja a polipeptid-funkciót az IL-2 szempontjából, is használható ebben a találmányban olyan mértékig, amíg a kapcsolt többlet-terület könnyen eltávolítható. Ez a helyzet azonos a DNS kapcsolt többlet-területénél, annak a génnek a 3' terminálásánál, amely az I, II, ill. III. Aminosav-szekvenciának felel meg; ez a DNS többlet-terület kódolja az I, II, ill. III. Amino-

sav-szekvencia C terminálásánál levő többlet aminosavakat. Ezért az ilyen polipeptideket kódoló gének alkalmazása szintén beletartozik a jelen találmányba.

5 A rekombináns DNS-eket, amelyek irányítják az IL-2 termelését az élő sejtekben, különböző módszerekkel lehet konstruálni. Így pl. az IL-2 cDNS kódoló szekvenciát be lehet iktatni egy kifejeződni képes hordozóba a
10 promotor-szekvenciától lefelé. Egy másik változat szerint egy promotor szekvenciát hordozó cDNS darabot be lehet iktatni az IL-2 kódoló szekvenciába fölfelé, mielőtt vagy miután a cDNS-t beiktatják a kifejeződni képes hordozóba.

15 A prokarióta vagy eukarióta sejtek — amelyek kifejezik az IL-2 cDNS-t és IL-2 polipeptidet termelnek — előállítási eljárását az alábbiakban sokkal pontosabban meggyarazzuk meg:

20 (1) Az IL-2 cDNS kifejeződése E. coli-ban
Abból a célból, hogy az IL-2 cDNS-t kifejezzük E. coli-ban, a cDNS-t egyesítjük különböző bakteriális promotorokkal, és a promotoroktól lefelé levő cDNS-t tartalmazó hibrid plazmidokat nyerünk. A plazmidokat be-
25 visszzük pl. E. coli HB101 törzsbe és humán IL-2 aktivitással rendelkező fehérje-terméket szintetizáló baktériumokat klónozzuk. Lényegében bármilyen bakteriális promotor irányíthatja az IL-2 cDNS kifejeződését, amikor azok megfelelően illeszkednek a cDNS-hez. Ilyen cDNS kifejeződésére itt írunk le példákat.

35 Az IL-2-höz klónozott cDNS egy 153 aminosavból álló polipeptidet kódol, amint ezt a 2. ábra mutatja. Az N-terminális terület, amely ennek a polipeptidnek mintegy 20 aminosavjának felel meg, meglehetősen hidrofób, és ez jellemző a legtöbb szekréciós fehérjére. Egy ilyen hidrofób szekvencia, az úgynevezett „szignál” szekvencia, lehasad a szekréciós folyamat során. Ezért az érett IL-2 polipeptidnek kevesebb, mint 153 aminosavat kell tartalmaznia. Ezért kívánatos kifejezni azt a cDNS-részt, amely kódolja az érett IL-2 polipeptidet, de nem kívánatos kifejezni azt a részt, amely az IL-2 „szignál” szekvenciának felel meg.

50 (i) Egy kifejeződni képes plazmid hordozónak, a pTrs-3-nak, amely magába foglalja az E. coli trp promotort, ennek riboszóma kötőhelyét (SD szekvencia) a vezető peptidhez, a konstrukcióját már korábban leírták (G. Miozari és Yanofsky, C.: J. Bacterial. 133, 1457—1466 (1978)), és leírták egy ATG kodont, amely 13 bp-re (bázispár) helyezkedik el az SD szekvenciától lefelé (Nishi és munkatársai: SEIKAGAKU, 54, 8, 676 (1982)). A plazmid hordozó szintén tartalmaz egy egyedi SphI helyet éppen az ATG induló szekvenciától lefelé (4. ábra).

65 Az IL-2 cDNS kifejeződése érdekében a plazmidot először SphI-el emésztjük, és vagy E. coli DNS polimeráz I-el kezeljük (Klenow-

-fragmens), vagy T4 bakteriofág polimeráz I-el, hogy eltávolítsuk a 3' kinyúló végeket (5(a) ábra). A pIL-2-50A plazmidot kétszer emésztjük, PstI-el és HgiAI-val, és egy nagyobb cDNS fragmenst izolálunk. A DNS-t ez után, vagy E. coli DNS polimeráz I-el kezeljük (Klenow-fragmens), vagy T4 bakteriofág DNS polimerázzal úgy, hogy a 3' kinyúló végek egy síkban legyenek. A fenti kezelt cDNS kódolja az IL-2 polipeptid 132 aminosavát, amint ezt az 5(a) ábra mutatja. Ezt a cDNS-t ezután hozzákapcsoljuk a fentiek szerint előkezelt pTrs-3 plazmidhoz, úgy, hogy az ATG indító kodon illeszkedjék az IL-2 cDNS CCT(Pro) szekvenciához. Így egy pTIL-2-22 plazmidot nyerünk. A pTIL-2-22 trp promotor szekvenciája és IL-2 cDNS szekvenciája közötti csatlakozást is bemutatja az 5(a) ábra.

A pTIL-22 plazmidnak kell irányítania az E. coli-ban a 132 aminosavat tartalmazó, prolinnal induló IL-2 polipeptid szintézisét.

(ii) Mivel az is lehetséges, hogy az érett IL-2 alanin (21. helyzet) tartalmaz N-terminális aminosavként prolin helyett, a következő plazmidról is értekezünk, amely irányítja a 133 aminosavat tartalmazó IL-2 polipeptid szintézisét.

A pTrs-3 plazmid tartalmaz egy egyedi Cla I helyet az SD szekvencia és az ATG szekvencia között (4. ábra). A plazmidot Cla I-el és Sal I-el emésztjük. A pIL-2-50A-plazmidot részlegesen emésztjük Pst I-el, kezeljük E. coli DNS polimeráz I-el és a legnagyobb lineáris DNS-t izoláljuk. A DNS-t azután összekapcsoljuk egy szintetikus DNS kapcsolóval, amely egy restrikciós Xho I hasítási helyet tartalmaz, és egy pIL-2-50A (Xho) plazmidot — amelybe a kapcsoló DNS be van vezetve az IL-2 kódoló szekvencia 3' végétől lefelé — tartalmazó klónt izolálunk. A pIL-2-50A (Xho) plazmidot először Hgi AI-el emésztjük, és vagy E. coli Klenow-fragmenssel, vagy T4 DNS polimerázzal kezeljük, Xho I-el emésztjük és a cDNS fragmenst izoláljuk. Ezt a cDNS fragmenst azután összekapcsoljuk pTrs-3 DNS-el, amelyet Cla I-el és Sall-el és egy szintetikus DNS-sel előkezeltünk, amint ezt az 5(b) ábra bemutatja. Így egy pTIL-2-21 plazmidot, amely irányíthatja egy 133 aminosavból álló, alaninnal kezdődő IL-2 polipeptid szintézisét E. coli-ban, nyerhetünk, amint ezt az 5(b) ábra bemutatja. Hasonló konstrukciókat lehet készíteni Xho I kapcsoló alkalmazása nélkül is.

(iii) Különböző méretű, különböző N-terminális aminosavval rendelkező IL-2 polipeptideket lehet előállítani a pTrs-3 kifejeződni képes plazmid hordozóval a következő eljárás szerint. A klónozó IL-2 cDNS a pIL-2-50A-ban tartalmaz egy egyedülálló Dde I helyet a 81.—85. nukleotid helyeknél. A pIL-2-50A (Xho) plazmidot Dde I-el emésztjük, és a cDNS nagyobb részét tartalmazó DNS fragmenst izoláljuk. A fragmens szintén tartal-

maz mintegy 3000 bázispárt a pBR 322-ből (5(c) ábra). A DNS fragmens Bal 31 exonukleázzal kezeljük, majd Xho I-el emésztjük. A fentebbi kezelt DNS-t azután összekapcsoljuk pTrs-3-mal, amelyet Sph I-el emésztünk, vagy Klenow-fragmenssel, vagy T4-DNS polimerázzal kezelünk, majd Sal I-el emésztünk, ahogyan ezt az 5(c) ábrában bemutatjuk. Az összekapcsolt DNS-t azután átvisszük E. coli HB101-be, és a humán IL-2-t kifejező bakteriális klónokat kiszűrjük. Ezek a klónok különböző méretű humán IL-2-t fejeznek ki, mivel a humán IL-2 N-terminálisnak megfelelő DNS különbözőképpen van elszakítva. Így IL-2 cDNS-t hordozó pTIL-2-14-et és pTIL-2-15-öt nyerhetünk.

(iv) Az IL-2 cDNS-t ki lehet fejezni pKT 218 alkalmazásával (K. Tolmaga ajándéka) (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 3369—3373 (1980)). A pKT218 plazmidot Pst I-el emésztjük és egy, a pIL-2-50A DNS-nek HgiAI-val és Pst I-el történő emésztésével nyert IL-2 cDNS-inzerttel kapcsoljuk össze. (6. ábra). A kapcsolás eredményeképpen létrejött pKIL-2-21 plazmid irányítja az egyesített polipeptid szintézisét E. coli-ban, amely egyesített polipeptid az IL-2 133 aminosavat tartalmazza és a β -laktamáz aminosavait (az első metionin le van hasítva az E. coli-ban).

(v) Egy pTuBIP-5 kifejeződni képes plazmidot, amelyben a promotor szekvencia a tuf B-hez van beiktatva pBR322-be, már korábban megalkottak (Taniguchi és munkatársai: SEIKAGAKU, 53, 966 (1981)). A plazmid egy egyedi Cla I helyet tartalmaz és ez 2 bp-re helyezkedik el az SD szekvenciától lefelé, amint ezt a 7. ábra mutatja.

Mivel a pTrs-3 szintén tartalmaz egy Cla I helyet az SD szekvencia és az ATG induló szekvencia között, és mivel ez a Cla I hely nem pusztul el egy kifejeződni képes plazmid megalkotása során pTrs-3 és IL-2 cDNS-t alkalmazva, amint ezt fentebb leírtuk, nagyon egyszerű helyettesíteni a bakteriális Trp promotort a tuf B promotórral úgy, hogy a humán IL-2 cDNS a tuf B promotor ellenőrzése alatt fejeződjék ki. Így pl. pTIL-2-22-t emésztünk Cla I-el és Pvu II-vel és az IL-2 cDNS-t tartalmazó DNS fragmenst izoláljuk. Ezt a fragmenst azután összekapcsoljuk pTUBIP-5 DNS-sel, elő-emésztjük Cla I-el és Pvu II-vel és egy pTIL-2-22 plazmidot alakítunk ki, amint ezt a 7. ábrában ábrázoljuk. Az IL-2 aktivitást a pTIL-2-22 plazmidot magába foglaló E. coli HB 101 extraktumban lehet kimutatni.

(vi) Hasonló konstrukciót lehet megalkotni pl. pTIL-2-21-et és lényegében minden olyan kifejeződni képes plazmidot alkalmazva, amelyet pTrs-3 alkalmazásával alakítottak ki. Lehet optimalizálni a távolságot az SD és ATG szekvenciák között pl. a pTIL-2-22 emésztésével Cla I-el, néhány DNS bázispárt eltávolítva (vagy hozzáadva) Bal 31 vagy SI vagy DNS polimeráz I (E. coli) segítségével, majd a plazmidot újra összekapcsolva.

(2) IL-2 cDNS kifejeződése élesztőben
Az IL-2 cDNS-t ki lehet fejezni élesztőben is a cDNS beiktatásával megfelelő kifejeződni képes vektorokba és a termék bevezetésével a gazdasejtbe. Különböző átvándorolni képes vektorokat, amelyek képesek kifejezni idegen géneket élesztőben, írták már le (Heitzman, R. és munkatársai: *Nature*, **293**, 717–722 (1981) Valenzuela, P. és munkatársai: *Nature*, **298**, 347–350 (1982); Miyano-hara és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1–5 (1983)). A vektorok képesek replikálódni mind *E. coli*, mind élesztő gazdaszervezetben és ezek tartalmaznak élesztő-gén promotor szekvenciákat. Lényegileg bármely ilyen kifejeződni képes vektort lehet használni IL-2 cDNS kifejeződéséhez. Magasabb szintű IL-2 előállítás is el lehet érni élesztő alkalmazásával az állati sejtekhez vagy a baktériumokhoz viszonyítva. Itt közülünk egy példát a humán IL-2 cDNS kifejeződésére élesztőben.

pAT77 és pAM82 élesztő-*E. coli* átvándorolni képes ("ingázó") vektorokat írtak le Miyano-hara és társai (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 1–5 (1983)). A pAM82 a pAT77-nek egy származéka és mindkettő hordoz *ars 1* (Stinchcomb, D. T. és munkatársai: *Nature*, **282**, 39–43 (1979)), *2 μm ori* (Broach, J. R. és munkatársai: *Gene* **8**, 121–133 (1979)) és *leu 2* (Ratzkin, B. és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 474–491 (1979)) markereket, valamint az élesztő savas foszfátáz (AP-áz) génjének promotorját. Ezek hordozzák még a pBR322 egy 3,7 kb-s DNS szegmensét, amely egy ampicillin rezisztencia markert (Ap^r) és a replikáció kiindulópontját hordozza (8. ábra). Az AP-áz promotor indukálható a foszfát nagy koncentrációjának kicserélésével kis koncentrációra a tápközegben. Abból a célból, hogy a humán IL-2 cDNS-t kifejezzük pIL2-50A-t emésztünk *PstI*-el, miután vagy *E. coli* Klenow-fragmenssel, vagy T4 DNS polimerázzal kezeltük, a cDNS-t összekapcsoljuk olyan pAM82-vel, amelyet előzőleg *XhoI*-el emésztettünk és *E. coli* Klenow-fragmenssel inkubáltunk, hogy a végeket kitöltsük. Hibrid plazmidokat, amelyekben a cDNS kódoló szekvencia az élesztő AP-áz promotor szekvenciától lefelé van, szelektálunk, *E. coli*-ban klónoztuk azokat. Az így nyert plazmidot, a PYIL-2a-t élesztőbe vezetjük be, majd az AP-áz promotor indukciója után az IL-2 aktivitást az élesztő-extraktumban mérjük. A PYIL-2a plazmid tartalmaz egy GC gyök szakaszt az élesztő promotor és az IL-2 cDNS között. Lehetséges, hogy egy ilyen szekvencia gátolja az IL-2 cDNS kifejeződését. Abból a célból, hogy ezt a problémát leküzdjük, a következő plazmid megalkotását végezzük el: pIL2-50A plazmidot emésztünk *PstI*-el és a cDNS inzertet izoláljuk. Ezt a cDNS-t azután T4 DNS polimerázzal kezeljük dATP, dGTP és dTTP jelenlétében úgy, hogy a C gyök szakaszai a cDNS mindkét végénél le legyenek szakítva, majd ezt követően Nuclease *S1*-el kezeljük, a

10

G-gyök szakaszainak eltávolítása érdekében. Ezt a DNS-t összekapcsoljuk *XhoI* DNS kapcsolóval és pBR 322 plazmiddal, amelynek *EcoRI* helyét lehasítjuk és *EcoRI*-val és Klenow-fragmenssel egy síkba hozzuk, és az így kapott plazmidot, a pIL2-Xho-t *XhoI*-el emésztjük és a cDNS inzertet izoláljuk. A cDNS-t azután bevezetjük pAM82 egyedi *XhoI* helyébe, és egy az élesztő AP-áz promotor szempontjából helyesen orientált IL-2 kódoló szekvenciát tartalmazó plazmidot klónozzuk *E. coli*-ban. Ezt a plazmidot, a pYIL-2b-t élesztőbe vezetjük be és az AP-áz promotor indukciója után, az IL-2 aktivitást az élesztő-kivonatban mérjük.

(3) A cDNS kifejeződése emlős sejtekben
Olyan plazmidot, amely irányítja a humán IL-2 szintézisét emlős sejtekben, a következőképpen hozhatunk létre: pCE-1 plazmidot hozunk létre pKCR-ből (O'Hare, K. és munkatársai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1527–1531 (1981)) és pBR328-ből (Soberon, X. és munkatársai: *Gene*, **9**, 287–305 (1980)), egy sor módosítási eljárás segítségével, ahogyan ezt a 3. ábrában bemutattuk, és az IL-2 gén ATG indító szekvenciáját összekötjük az SV 40 korai gén promotorjától lefelé. Ez a plazmid egy egyedi *PstI* helyet tartalmaz éppen az SV 40 promotortól lefelé és egy intront tartalmazó nyúl β-globin kromoszomális gén résztől fölfelé. A plazmid szintén tartalmazza az SV 40 replikációs kezdőpontot, valamint a korai gén poliadenilációs helyet. Így egy pCEIL-2 plazmidot nyerünk, amelyben az IL-2 struktúr gént át lehet írni az SV 40 korai promotor génből a megfelelő gazdasejtben (3. ábra).

Ezt a plazmidot emésztjük *HhaI*-al, majd DNS-átvitellel bevezetjük a COS7 transzformált majomsejtbe, amely az SV 40 kezdőpont szekvenciát tartalmazó DNS replikációját lehetővé teszi. Fontosnak látszik a plazmid emésztése *HhaI*-al az átvitel (transzfekció) előtt a cDNS hatásos kifejeződése érdekében, mivel azok a szekvenciák, amelyek akadályozzák az átvitt DNS replikációt a COS sejtekben, eltávolíthatók a cDNS kifejeződéséhez szükséges plazmid lényeges részéből ezzel a módszerrel 1–3 napos tenyészetekben (ennek a vektornak a tenyésztett COS-7 majomsejtbe átvitelétől számítva) hagyományos tenyésztési körülmények között (Gluzman, Y.: *Cell*, **23**, 175–182 (1981)) az IL-2 általában kiválasztódik és termelődik a tenyésztett sejt tápközegében. Abból a célból, hogy a kibővített DNS-t beiktassuk más eukarióta sejtekbe, hasonló módon egy, a gazdaszervezetnek megfelelő vektort kötünk össze egy prokarióta sejtől kihasított és izolált cDNS inzerttel, és az eukarióta sejtbe átvihetünk ilyen módon szintetizált vektort és tenyészthetjük.

A rekombináns DNS-t beépítő sejteket tenyészítjük vagy a rekombináns DNS sokszorozása, vagy az IL-2 polipeptid termelése érdekében. A tenyésztést hagyományos módon

hajthatjuk végre. Így pl. a transzformált élesztőt szénforrást, nitrogénforrást, szervetlen sókat és szükség esetén egyéb szerves tápanyagokat, mint pl. vitaminokat és aminosavakat tartalmazó tápközegben, 20°C–37°C közötti hőmérsékleten és 4–7 pH közti tartományban, aerob körülmények között tenyészthetjük. A transzformált prokarióta organizmusokat, mint pl. *E. coli*-t vagy *B. subtilis*-t szintén hagyományos körülmények között lehet tenyészteni.

Az intracellulárisan vagy extracellulárisan termelt IL-2-t bármilyen ismert módszerrel ki lehet nyerni, úgy mint ammónium-szulfátos kicsapás, dialízis a sók eltávolítása érdekében (normál nyomáson vagy vákuumban), gél-szűrés, kromatográfia, preparatív lapos ágyas izoelektromos fókuszálás, gél-elektroforézis, nagy felbontású folyadékkromatográfia (a továbbiakban HPLC), ioncsere, gél-szűrés és fordított fázisú kromatográfia és affinitás-kromatográfia festékkel kötött hordozón, IL-2 elleni monoklonális antitesttel kapcsolt aktivált Sepharose 4B-n, vagy lektinnel kötött Sepharose 4B-n, stb. Az IL-2 kinyerésének és tisztításának módszereit többen leírták (Watson és munkatársai: J. Exp. Med. 150, 849–861 (1979), Gillis és munkatársai: J. Immunol. Methods, 39, 185–201 (1980), és Welte, K. és munkatársai: J. Exp. Med. 156, 454–464 (1982)).

Az így nyert polipeptidet azonos biokémiai és biológiai viselkedést mutat, mint az ismert IL-2, amelyet mitogénnel stimulált emlős sejttel állítottak elő, és IL-2 aktivitása is van. A molekulatömeg mintegy 15 000 dalton és az IL-2 aktivitás tökéletesen semlegesíthető vagy kicsapódik monoklonális anti-IL-2 antitesttel immunoabszorbensek, mint pl. Igsorb (Enzyme Center) jelenlétében vagy távollétében. Immunelektroforézisben az IL-2 polipeptid csupán egyetlen csapadékot mutat a megfelelő anti-IL-2 antitest ellen. Az IL-2 aktivitás stabil marad 2-merkaptó-etanolal történő redukció után, és ez az aktivitás ellenáll a DNÁ-zsal és RNA-zsal történő kezelésnek, valamint az 56°C hőmérsékleten 30 percig tartó hőkezelésnek. Az aktivitás stabil 2 és 9 pH értékek között. A termelt IL-2 elősegíti a monoklonális funkcionális T sejtek (citotoxikus T-limfocita) növekedését, növeli a timocita mitogenezist, emeli az antitumorspecifikus citotoxikus T limfociták létrehozását az emlékezeti helyzetből az antigén távollétében, és lehet használni a természetes gyilkos sejt aktivitás fokozására YAC-1 és RLó 1 sejtek ellen.

A találmányt általánosságban már leírtuk, ugyanez sokkal érthetőbbé válik, ha bizonyos jellegzetes példákra utalunk, amelyek azonban csak a szemléltetés célját szolgálják és nem jelentenek korlátozást, hacsak másképpen nem jelezzük.

1. Példa

(1) Humán T leukémia sejtvonalat, Jurkat sejteket (amelyek Japánban, Nyugat-Német-

országban és az Egyesült Államokban rendelkezésre állnak) szuszpendáljuk 10 térf./térf.% FCS-t tartalmazó RPMI 1640 tápközegben és Röntgen-sugárral besugározzuk 10 000 röntgenig szobahőmérsékleten 50 másodpercen át, Exs 150/300–4 (Toshiba, Japán) röntgen-besugárzó készüléket használva, és ezután a besugárzott sejteket 5 napon át 37°C hőmérsékleten 5% CO₂ inkubátorban tenyésztjük 1×10⁵ sejt/ml kezdeti sejtsűrűséggel a fentebb említett tápközegben. A mutált sejteket (0,2 sejt/üreg) 10 db, 96 üreggel ellátott laposfenekű mikrolemez üregeibe helyezzük, és 37°C hőmérsékleten 5% CO₂ inkubátorban tenyésztjük 21 napon át.

A növekedést mutató üregekből nyert klónokat ismételten átvisszük friss tápközegbe a klón-méret burjánzása érdekében és a burjánzott klónokat 24 órán át tenyésztjük 1×10⁶ sejt/ml kezdeti sejtsűrűségnél 50 µg/ml Con A jelenlétében és az IL-2 aktivitást a korábban leírt módszer szerint megmérjük. Ennek következményeként egy humán T sejt vonalat, amely Jurkat-111-nek jelölünk (a továbbiakban „J-111”) (ATCC 2RL 8129), és amelyet a szülő Jurkat-sejtből klónoztunk, szelektálunk, amelynek IL-2 termelőképesége a negyvenszeresére emelkedett a szülő törzs termelőképeségéhez viszonyítva. A J-111 klónozott sejtvonal növekedhet a szokásos körülmények között és a növekedési sebesség csaknem azonos azzal, amelyet a közönséges Jurkat sejt mutat.

(2) 1×10⁵/ml J-111 sejtet inokulálunk 1000 ml szérummentes szintetikus tápközegben (RITC 55-9) (Sato, T. és munkatársai: Exp. Cell. Res. 138, 127–134 (1982) hengeres tenyésztő palackokban (Falcon 3027) és 4 napon át tenyésztjük 37°C hőmérsékleten, és a szaporított sejteket centrifugálással kinyerjük. A kinyert sejteket ismét inokuláljuk 4×10⁶ sejt/ml koncentrációban a fentebb említett tápközegben, amelyhez 25 µg/ml koncentrációban ConA-t adtunk. Hengeres tenyésztő palackok (Falcon) négy darabja képez egy tételt, 1000 ml inokulált tenyészetet helyezünk minden egyes tételbe.

(3) 1,2×10⁶ 25 µg/ml ConA-val 6 órán át stimulált Jurkat sejtet szuszpendálunk 8000 ml fiziológiás sóoldattal kiegyensúlyozott foszfát pufferban (a továbbiakban PBS). A sejteket kétszer mossuk centrifugálással és újra szuszpendáljuk 800 ml RSB oldattal (10 mmól/liter Tris-HCl, pH 7,5; 10 mmól/liter NaCl; 1,5 mmól/liter MgCl₂), amely ribonukleozid-vanadil komplexet (10 mmól/liter), amely nukleáz-inhibitor, tartalmaz. Ezután NP-40 detergenst adunk hozzá, hogy a végső koncentrációja 0,05% legyen, majd gyengén keverjük és a sejtmagokat 5 perces centrifugálással eltávolítjuk 3000 rpm-nél 4°C hőmérsékleten. SDS-t (0,5%) és EDTA-t (5 mmól/liter) adunk a felülúszóhoz és a citoplazma RNS-t azonos térfogatú fenol hozzáadásával extraháljuk. Háromszori fenolos

extrakció után az RNS-t kicsapjuk két térfogat etanollal és a csapadékot centrifugálással ki-
gyűjtjük, amelyet oldhatóvá teszünk 10 mmól/
liter Tris-HCl pufferban (pH 7,5). A nyert
RNS mennyisége 196 mg.

Az mRNS frakcionálását oligo(dT)-cellu-
lőzon történő affinitás-kromatográfiát alkal-
mazva hajtjuk végre (P. L. Biochemicals,
7. típus). Az adszorpciós oldat összetétele:
20 mmól/liter Tris-HCl, 0,5 mól/liter NaCl,
1 mmól/liter EDTA és 0,5% SDS, pH-ja 7,5,
és az elúciót vízzel és 10 mmól/liter Tris-HCl-
el (pH 7,5) hajtjuk végre, az oszlop átmosása
után pufferral. (20 mmól/liter Tris-HCl,
pH 7,5, 0,5 mól/liter NaCl, 1 mmól/liter
Tris-HCl). Az így nyert eluált mRNS 3,6 mg.
Ez után 2,4 mg így nyert mRNS-t szacharóz
sűrűség gradiens centrifugálással frakcionál-

5 juk (5—2,5% szacharóz sűrűség gradiens
egy pH 7,5-ös oldatban, amelynek összetétele
50 mmól/liter Tris-HCl, 1 mmól/liter EDTA
és 0,2 mól/liter NaCl, centrifugálás 26,000
ford/perc sebességgel 24 órán át 4°C hő-
mérsékleten) és az mRNS 11—12S frakció-
ját a 12., 13. és 14. frakciókba frakcionáljuk
59 µg, 46 µg, illetve 60 µg mennyiségben,

10 (4) A 13. frakcióban nyert mRNS-t mikro-
injektáljuk *Xenopus* laevis oocitáiba (50 ng
mRNS/tojás) és a tenyészet felülúszója szol-
gál az IL-2 aktivitás mérésére. Amint az
1. Táblázat mutatja, a ³H TdR beépülésének
15 növekedése és az aktivált T-limfociták számá-
nak növekedése bebizonyítható, világosan iga-
zolva, hogy az mRNS ebben a frakcióban
tartalmaz humán IL-2 mRNS-t.

1. Táblázat

/a/

Minta	Hígítás	³ H-TdR befo- gás /cpm/	IL-2 mennyisége ^x /egység/ml/
Kontroll I	--	553	0
/közeg a méréshez/			
Kontroll II	X2	590	0
/nem kezelt tojás- tenyészet felülúszó- ja/	X3	572	
13. frakció	X8	14,683	32
transzlációs terméke	X32	10,165	

/b/

	Hígítás	T-limfocita sejtszám /db/üreg/	IL-2 mennyisége ^x /egység/ml/
Kontroll I	X2	0	0
/Közeg a méréshez/	X16	0	
Kontroll II	X2	0	0
/A nem kezelt tojás- tenyészet felülúszó- ja/	X16	0	
A 13. frakció	X2	115	40
transzlációs terméke	X16	55	

x Az egységet úgy kalkuláljuk, hogy összehasonlítjuk a beépített ³H-TdR men-
nyiséget a standard IL-2 mennyiségével /10 egység/ml/ probit-analízis
szerint

(5) Ez után cDNS-t szintetizálunk az
IL-2 mRNS-t tartalmazó 11—12S mRNS
13. frakciójából *in vitro* és rekombináns DNS-t
képezünk pBR322 plazmid vektorral. *Escheri-*
chia coli-t transzformálunk a rekombináns

DNS-el, és az IL-2 cDNS-t szerzett klónokat
a következőképpen szelektáljuk:

65 (5—1) 50 mmól Tris-HCl puffert (pH 7,5),
30 mmól NaCl-t, 6 mmól MgCl₂-t, 5 mmól
ditiotritolt (a továbbiakban DTT), 0,5 mmól

dATP-t, dGTP-t, dCTP-t, dTTP-t (a dCTP ^{32}P radioaktívan jelzett), 0,7 μg oligo (dT) $_{10}$ -et, 10 μg mRNS-t és 15 egység AMV reverz transzkriptázt (J. W. Beard) összekeverünk és 90 percen át 41°C hőmérsékleten tartunk.

A reakció leállítása után a DNS-t kinyerjük fenolos kezelés után etanolos csapadékként, és a DNS-t feloldjuk egy 7,5 pH-jú oldatban, amely 20 mmól/liter Tris-t és 1 mmól/liter EDTA-t tartalmaz.

2,5 μg ss-cDNS-t szintetizálunk. Hogy el-távolítsuk az oldatban jelen levő mRNS-t, az oldatot 0,33 n NaOH koncentrációra állítjuk be NaOH hozzáadásával, 15 órán át szobahőmérsékleten állni hagyjuk, majd az oldatot semlegesítjük azonos térfogatú 1 mól/literes Tris-HCl pufferrel (pH 7,5) és Sephadex G-50 oszlopon átengedjük.

A kinyert cDNS 1,8 μg .

(5—2) 50 mmól foszfát puffert (pH 7,5), 10 mmól MgCl_2 -t, 10 mmól DTT-t, 0,75 mmól dATP-t, dGTP-t, dCTP-t és dTTP-t (a dCTP ^3H radioaktívan jelzett), 1,8 μg ss-cDNS-t és 8 egység polimeráz I-et (BRL, Egyesült Államok) összekeverünk és reagálni hagyjuk 15 órán át 15°C hőmérsékleten. A reakció leállítása után a DNS-t kinyerjük fenolos és kloroformos kezelés után etanolos csapadék formájában. 1,10 μg ds-cDNS-t alakítunk ki. 50 mmól nátrium-acetátot (pH 4,5), 0,2 mól NaCl-t, 1 mmól ZnCl_2 -t és 1,10 μg ds-cDNS-t inkubálunk 20 percen át 37°C hőmérsékleten, 0,25 egység nukleáz S_1 -et (Sankyo, Japán) adunk hozzá, majd további 15 percen át inkubáljuk.

A reakció leállítása után a reakcióterméket, amelyet kétszer kezelünk fenollal, Sephadex G-50-re visszük; így 0,55 μg ds-cDNS-t nyerünk.

(5—3) 0,14 mól kálium kakodilát, 30 mmól Tris bázis, 0,1 mmól DTT, 1 mmól CaCl_2 , 0,64 mmól ^{32}P -dCTP (fajlagos aktivitás $2,7 \times 10^6$ cpm/nmól), 0,55 μg ds-cDNS és 5 egység terminális transzferáz (BRL) keverékét inkubáljuk 7 percen át 37°C hőmérsékleten, majd fenolos kezelés után Sephadex G-50 oszlopra visszük, 0,5 μg DNS-t nyerve etanolos csapadék formájában. A kinyert DNS-ről azt találjuk, hogy mintegy 50 dCMP gyökkel kiterjedt mindkét 3' terminálisnál. 10 μg pBR 322 DNS-t hasítunk PstI restrikciós enzimmel és a hasított DNS 3'-terminálisát egyesítjük a dGMP láncsal ugyanazzal a módszerrel, ahogyan azt a dCMP hozzáadásánál ds-cDNS-hez bemutattuk korábban, azzal a kivétellel, hogy dCTP helyett dGTP-t alkalmazunk.

(5—4) 50 mmól Tris-HCl puffer (pH 7,5), 0,1 mól NaCl, 5 mmól EDTA, 0,05 μg pBR322 (amelyet dGMP gyökkel meghosszabítottunk) és 0,01 μg cDNS (amelyet dCMP-vel nyújtottunk meg) keverékét először 2 percen át inkubáljuk 65°C hőmérsékleten, majd 120 percen át 46°C hőmérsékleten, majd 60 percen át 37°C hőmérsékleten és végül 60 percen át szobahőmérsékleten. E. coli K 1776 (Curtiss

III, R. és munkatársai: Molecular Cloning of Recombinant DNS (szerkesztette: W. A. Scott és R. Werner), Academic Press (1977)) törzset inokulálunk 50 ml L-tápközegben, amely 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diamino-pimelinsavat, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ timidint, 1% triptofánt, 0,5% élesztőkivonatot, 0,5% NaCl-t és 0,1% glükózt tartalmaz, és rázatva inokuláljuk 37°C hőmérsékleten, amíg a tenyésztő tápközeg abszorpciója 562 nm-nél mintegy 0,3 O.D (optikai sűrűség) lesz. A tenyésztés befejezése után a tenyésztő folyadékot 0°C hőmérsékleten tartjuk 30 percen át, majd a baktériumsejteket centrifugálással összegyűjtjük, 25—25 ml oldattal kétszer mosuk, az oldat összetétele: 5 mmól/liter Tris-HCl (pH 7,6), 0,1 mól/liter NaCl, 5 mmól/liter MgCl_2 és 10 mmól/liter RbCl.

Az így nyert sejteket 20 ml 5 mmól/liter Tris-HCl-t (pH 7,6), 0,25 mól/liter KCl-t, 5 mmól/liter MgCl_2 -t, 0,1 mól/liter CaCl_2 -t és 10 mmól/liter RbCl-t tartalmazó oldatban szuszpendáljuk és állni hagyjuk 0°C hőmérsékleten 25 percen át, majd a sejteket összegyűjtjük és újra szuszpendáljuk azokat 1 ml fenti oldatban, a fentebb leírt rekombinációs DNS-t hozzáadjuk 0,2 ml sejtuszuspenzióhoz és a szuszpenziót 0°C hőmérsékleten 60 percig állni hagyjuk. Ez után 0,7 ml L-tápközeget adunk a tenyészethez, és 30 percig rázatjuk 37°C hőmérsékleten. Az így nyert tenyésztő-tápközeget (0,1 ml) alaposan elszélesztjük egy 1,5%-os agaróz tápközeg felületén, amely 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diamino-pimelinsavat, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ timidint és 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetraciklint tartalmazó L-tápközegből van összeállítva, és 37°C hőmérsékleten inkubáljuk két napon át.

(5—5) Négy százharminckét feltűnt telepet 18 csoportra osztunk, mindegyik 24 különböző bakteriális klónt tartalmaz, inokuláljuk 200 ml 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ diamino-pimelinsavat, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ timidint és 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tetraciklint tartalmazó L-tápközegen és tenyésztjük rázás közben 37°C hőmérsékleten 5—7 órán át. Majd 200 ml friss, klóramfenikolt tartalmazó L-tápközeget 170 $\mu\text{g}/\text{ml}$ végső koncentrációval adunk a tenyészethez és tovább tenyésztjük egy éjszaka át. Az így sokszorozott plazmid DNS-t hagyományos módon tisztítjuk. IL-2 cDNS-sel rendelkező klónokat rostáljuk át mRNS hibridizációs-transzlációs vizsgálattal (a továbbiakban „H-T vizsgálat”). Az itt alkalmazott HT vizsgálatot a következőképpen hajtjuk végre: 25 μg tisztított DNS-t hasítunk el Hind III restrikciós enzimmal, háromszor kezeljük fenollal, majd kezeljük fenol-kloroformmal, illetve kloroformmal, kicsapjuk etanollal, mossuk 80% etanollal és feloldjuk 40 μl 80%-os formamidban.

A reakciót a denaturálás érdekében 90°C hőmérsékleten 5 percen át melegítjük, majd hígítjuk a 10XSSC-vel, amelynek összetétele 1,5 mól/liter NaCl, 0,15 mól/liter nátrium-citrát. A DNS-t ezután rögzítjük nitrocellulóz szűrőre, amely szűrőt 80°C hőmérsékleten 3 órán át szárítottunk, majd 18 órán át

inkubáljuk 37°C hőmérsékleten egy 50% formamidot, 20 mmól/liter Pipes puffert (pH 6,5), 0,75 mól/liter NaCl-t, 3 mmól/liter EDTA-t, 0,2% SDS-t és 250 µg, indukált J-III sejtekből származó poli(A)mRNS-t tartalmazó oldatban abból a célból, hogy a szűrőn rögzített DNS-t hibridizáljuk IL-2 mRNS-sel. Ez után a szűrőt 65°C hőmérsékleten háromszor mossuk 10 mmól/liter Pipes-t (pH 6,5), 0,15 mól/liter NaCl-t tartalmazó, majd 1 mmól/liter Pipest, 10 mmól/liter NaCl-t tartalmazó oldattal, majd kezeljük 0,5 mmól/liter EDTA-t és 0,1% SDS-t tartalmazó oldattal 95°C hőmérsékleten 1 percen át, hogy visszanyerjük a hibridizált mRNS-t a szűrőről. Az így extrahált mRNS-t oligo dT-cellulóz oszlopon tisztítjuk hagyományos módszerrel, és *Xenopus* oocitákba injektáljuk, hogy meghatározzuk a transzlációval átalakult fehérje IL-2 aktivitását. A 18 csoportból egy (minden csoport 24 klónt tartalmaz) ad pozitív, 48 egység/ml IL-2 aktivitást ³H-TdR beépülési vizsgálat alapján, amelyet korábban ismertettünk, míg a többiek világosan negatívak. A pozitív csoportba tartozó 24 egyedi telepet ez után inokuláljuk 200 ml, a korábban leírt összetétellel azonos L-tápközegben, aerob körülmények között tenyésztjük 5–7 órán át 37°C hőmérsékleten és hasonlóképpen klóramfenikolt tartalmazó friss L-táp-

közeget adunk ismét hozzá. A plazmid DNS kiegészülése után egy éjszakán át történő tenyésztéssel, a plazmid DNS-t a standard eljárás szerint tisztítjuk. Az egyes plazmid DNS-ek mintegy 5 µg-jának elhasítása után Hind III-mal, minden egyes plazmid DNS-t hasonlóképpen nitrocellulózhoz kötünk. A szűrőket hibridizáljuk IL-2 mRNS-sel és a hibridizált mRNS-t kinyerjük, hogy *Xenopus* oocitákba injektálhassuk a transzlációval átalakult fehérje IL-2 aktivitásának meghatározása érdekében.

Amint a 2. Táblázat bemutatja, csak egy telepből tisztított plazmid DNS, p3-16-ként jelzett, ad pozitív IL-2 aktivitást. Ezért ezt a klónt azonosítottuk, mint IL-2 cDNS-sel rendelkező klónt (*E. coli* K 1776) p3-16 AJ 11995 (FERM-BP-225). Így a p3-16 plazmid DNS-ről bebizonyult, hogy része az a DNS (IL-2 gén), amely képes specifikus hibridet képezni IL-2 mRNS-sel.

A p3-16 cDNS inzertje olyan jellegzetességeket mutat, hogy hasítható *Xba*I restrikciós enzimmel egy egyedi helyen és *Bst*NI-el két helyen (egy azonos irányban és egy ellenkező irányban az *Xba*I hasítási helyhez). A p3-16 plazmid egy mintegy 650 bázispárt tartalmazó cDNS inzertet tartalmaz, amely látszólag megfelel a 11-12S IL-2 mRNS egy részének.

2. Táblázat
/a/

Minta	Hígítás	³ H-TdR befogadás /cpm/	Az IL-2 mennyi- sége/egység/ml/
I. Kontroll /Közeg a meghatározáshoz/	--	2,010	0
II. Kontroll /a nem kezelt tojás tápközeg-folyadékjában felülúszója/ mRNS transzlációs terméke	X2 X32 X2 X32	2,120 2,482 20,453 20,961	0 58

/b/

Minta	Hígítás	T-limfocita sejt- szám/sejt/üreg/	Az IL-2 mennyi- sége/egység/ml/
I. Kontroll /Közeg a meghatározáshoz/	--	0	0
II. Kontroll /a nem kezelt tojás X32	X2	0	0

2. táblázat (folyt.)

Minta	Hígítás	T-limfocita sejt- szám/sejt/üreg/	Az IL-2 mennyi- sége/egység/ml/
tápközeg-folyadékjá- nak felülúszója/ mRNS transzlációs terméke x	X2 X32	88 42	32

x mRNS a p3-16 plazmidból nyert cDNS-sel hidridizálva.

1 Egy másik cDNS „könyvtár”-at készítettünk Land és munkatársai módszere szerint (Nucleic Acids Res. 9, 2551 (1981)), IL-2 mRNS-t alkalmazva templátként. Egyszálú cDNS-t (1,6 µg) szintetizálunk 4 µg IL-2 mRNS-t alkalmazva, amelyet dCMP gyökkel meghosszabítottunk; és ds-cDNS-t szintetizálunk oligo (dG)₁₂₋₁₈-at alkalmazva leolvasó mintaként (primerként) DNS polimeráz I-hez (Klenow-fragmens). A 680 bázispár DNS méretjellemzőnél hosszabb cDNS-t (0,6 µg) kinyerjük szacharóz gradiens centrifugálással és beiktatjuk a pBR322 PstI helyére standard G-C farokképző módszerrel. Az *E. coli* K 1776 transzformáció után rekombináns DNS-sel, mintegy 2000 telepet vizsgálunk át Grunstein-Hogness *in situ* hibridizációs módszerrel nick-transzlatált p3-16 cDNS inzertrrel, mint vizsgáló mintával és a mintegy 850 bázispárt tartalmazó pIL2-50A plazmidot tartalmazó telepet és a transzformált klónt (*E. coli* K 1776) pIL2-50A, AJ 11996 (FERM-BP-226) azonosítjuk. A pIL-2-50A cDNS inzert restrikciós endonukleáz hasítási térképét mutatja be az 1. ábra.

Hogy a transzformált *E. coli* K 1776 pIL2-50A-ból IL-2 peptidet kódoló gént izoláljunk, plazmid DNS-t emésztünk PstI restrikciós enzimmel a sejtekből nyert DNS-terület izolálása után hagyományos módon. Az így létrehozott két DNS fragmens közül a kisebbik kialakított fragmens az IL-2 peptidet kódoló DNS gén. A pIL2-50A-ból származó PstI inzert teljes nukleotid szekvenciáját Maxam és Gilbert eljárása szerint határozzuk meg (Maxam A. W. és munkatársai: Enzym. 65, 499—560 (1980)), és a teljes szerkezetet mutatja be a 2. ábra.

2. példa

A pKCR plazmid (O'Hare és munkatársai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 3, 1527—1531) a következő részekből áll: (i) egy korai gén promotort és egy replikációs kiinduló-pontot (0,725—0,648 Morgan egység) és egy korai génből származó poliadenilációs helyet tartalmazó SV 40 DNS szegmens (vonalkázott szakaszaként bemutatva a 3. ábrában); (ii) a nyul β-globin génjének egy része (nyitott szakaszaként bemutatva) (BamHI-PvuII frag-

mens); (iii) egy replikáció kiinduló pontot és ampicillin rezisztencia gént tartalmazó pBR322-ből származó szegmens (EcoRI-BamHI fragmens). Ezt a plazmidot BamHI-vel hasítjuk el és miután a hasított DNS mindkét végét kitöltöttük DNS polimeráz I-el (Klenow-fragmens), egy szintetikus PstI kötő DNS-t vezetünk be, így hozva létre a pKCR (PstI)-et. A pKCR(PstI) plazmidot SalI-el elhasítjuk, Klenow-fragmenssel kezeljük, hogy kitöltsük a végeket, majd részlegesen elhasítjuk EcoRI-el, hogy EcoRI-SalI fragmenst nyerjünk, amely tartalmazza az SV40-ből származott teljes DNS-t és a globin gént. Ezt a fragmenst azután összekapcsoljuk a megfelelő enzimmel hasított pBR 328 DNS egy olyan darabjával, amely a tetraciklin rezisztencia gént és a replikáció kiindulási pontját tartalmazza, amint ezt a 3. ábra körvonalazza. Az ilyen módon létrejött pCE-1 plazmid tartalmaz egy egyedi PstI helyet éppen az SV40 korai promotortól lefelé.

A pIL2-50A cDNS inzertjét PstI hasítással elmetsszük és PstI-hasított pCE-1-et kapcsoljuk össze, így hozva létre pCEIL-2-t, amelyben az IL-2 struktúrgén kifejeződése az SV40 korai promotor ellenőrzése alatt áll. A pCE-1 plazmidot eredetileg a cDNS klónozásához alakították ki a G-C farokképző módszerrel (Chang, A. C. Y. és munkatársai: Nature, 275, 617—624 (1978)) baktériumokban és közvetlen kifejeződéshez emlős sejtekben.

Ezt a plazmidot HhaI-el emésztjük, majd DNS-átvitellel (transzfekcióval) (McCutchan és munkatársai: J. Natl. Cancer Inst. 41, 351—357 (1968)) a COS-7 transzformált májsejtvonalba vezetjük be, amely lehetővé teszi az SV 40 kiinduló pont szekvenciát tartalmazó DNS replikációját, és amely Gluzman Y.-tól állt rendelkezésre (Cell, 23, 175—182 (1981)). Fontosnak látszik a HhaI plazmid emésztése az átvitel (transzfekció) előtt a cDNS hatásos kifejeződése érdekében, mivel azok a szekvenciák, amelyek gátolhatják az átvitt DNS replikációját a COS sejtekben, eltávolíthatók az ezzel az eljárással történő cDNS kifejeződéshez szükséges plazmidok jelentős részéből. COS-7 sejteket (6×10^4 /ml)

szuszpendálunk 0,5 ml 5% FCS-t tartalmazó DMEM tápközegben, 24 üreges tenyésztő lemezben (Nunc) és 4 órán át inkubáljuk 37°C hőmérsékleten. Ez után 1 µg fentebb leírt vektor, 17,6 µl 1 mmól/literes, 0,1 mmól/liter EDTA-t tartalmazó Tris-HCl, 2,4 µl 2 mól/literes CaCl₂ és 120 µl 2xHBS (amely 50 mmól/liter Pipes-t, 280 mmól/liter NaCl-t és 1,5 mmól/liter Na₂HPO₄·12H₂O-t tartalmaz) (pH 7,10) keverékét adjuk hozzá a tenyésztett sejtekhez. A sejteket tovább inkubáljuk 4 órán át, 37°C hőmérsékleten, és a tápközeget leszívjuk, 1 ml PBS-sel mossuk, majd 0,5 ml 20% glicerint tartalmazó PBS-t adunk hozzá, szobahőmérsékleten hagyva 3 percen át. A tápközeget ismét leszívjuk és a

sejteket 1 ml PBS-sel mossuk, és 1 ml, 5% FCS-t tartalmazó DMEM-ben tenyésztjük. Minden 24 órában 500 µl tápközeget kicserélünk friss tápközegre. Minden egyes tápközeget, amelyet a megfelelő időközönként összegyűjtöttünk, 4°C hőmérsékleten tartunk felhasználásig. Az átvitel (transzfekció) után 2–3 nappal a tenyésztett sejt tápközeget IL-2 aktivitásra megvizsgáljuk. Amint a 3. Táblázat mutatja, az eljárás eredményeként létrejött tenyészet felülúszója — a tenyészet az átvitt PCEIL-2-t tartalmazó COS-7 sejt — tartalmaz IL-2 aktivitást. IL-2 aktivitás nem volt kimutatható az átvitt pCE-1-et tartalmazó sejtek tápközegében.

3. Táblázat

DNS, amelynek átvitele /transzfekciója/ megtörtént	IL-2 aktivitás ³ H-TdR befogadással mérve /egység/ml/	T-limfocita növekedés
pCEIL-2	12	++++
pCE-1	1	--

A tenyészet tápközegében talált IL-2 aktivitás a COS-7-be történt pCEIL-2 átvitel (transzfekció) után semlegesíthető 12 egység/ml — 1 egység/ml egér (BALB) c) anti-humán IL-2 monoklonális antitesttel. Az az eredmény, hogy a pCEIL-2 átvitele után a COS-7 sejt humán IL-2-t választ ki, világosan mutatja, hogy egy IL-2 polipeptidet kódoló gént és egy, az említett sejtben replikálódni képes vektor DNS-t tartalmazó rekombináns DNS-sel transzformált eukarióta sejt határozottan alkalmazható az IL-2 előállítására.

Az *E. coli* HB101-ben beépült pCEIL-2 (AJ 12008) plazmidot letétbe helyeztük FERM-BP244 bevételi számon.

3. Példa

Az 1. példában elkészített *Escherichia coli* K 1776 pIL-2-50A (AJ 11996 (FERM-BP-226)) törzset inokuláljuk 250 ml, 100 µg/ml diamino-pimelinsavat, 50 µg/ml timidint, 1% triptofánt, 0,5% élesztőkivonatot, 0,5% NaCl-t és 0,1% glükózt tartalmazó L-tápközegben, és rázás közben tenyésztjük 37°C hőmérsékleten, amíg a tenyésztő tápközeg optikai sűrűsége 562 nm-en 0,5 lesz. A tenyésztés leállítását követően a tenyésztő tápközeget 0°C hőmérsékleten 30 percig állni hagyjuk, és a sejteket centrifugálással kinyerjük, egyszer mossuk 20 mmól/liter Tris-HCl-lel (amely 30 mmól/liter NaCl-t tartalmaz) és újra szuszpendál-

35

juk 1,8 ml ugyanilyen összetételű pufferban. 0,2 µl/ml-es lizozim-oldatból és 20 µl 0,5 mól/literes EDTA-ból álló oldatot adunk ez után a sejtekhez és a keveréket állni hagyjuk 0°C hőmérsékleten 20 percen át, ezt követően háromszor egymás után fagyasztás-felengedési folyamatnak vetjük alá. A sejtek extraktumát (1,5 ml) nyerjük ki 40 000 ford/perccel végzett 30 perces centrifugálás után. Az extraktumot kimosásnak vetjük alá 85% ammónium-szulfáttal, Sephadex G15-ön eltávolítjuk a sókat, majd DEAE cellulóz oszlopkromatográfiát alkalmazunk és a 0,06 mól/liter Tris-HCl pufferrel (pH 7,6) eluált frakciókat fagyasztva szárítjuk és ellenőrzött porúsú üvegágy (250 Å, Funakoshi Pharmaceuticals, Japán) kromatográfiának vetjük alá, így kapva meg a 0,3 mól/liter glicin-HCl pufferral eluált frakciókban az IL-2 aktivitást, ahol az IL-2-t tartalmazó frakció 12 egység/ml IL-2 aktivitást fejt ki. Az eredmények világosan jelzik, hogy az *E. coli* K 1776 pIL2-50A, AJ 11996 ténylegesen termel IL-2-t.

4. Példa

60

J-A 1886 (ATCC CRL 8130) konstitutív IL-2 termelő sejtvonalat, amelyet az 1. példában leírt módon Jurkat sejtekből klónoztunk, hasonlóképpen hengeres tenyésztőpalackban növesztünk. A kinőtt sejteket újra szuszpendáljuk RITC-55-9 friss szintetikus tápközegben 1×10⁶ sejt/ml induló sejtsűrűséggel, és

65

8 órával a tenyésztés megkezdése után a sejteket az IL-2 mRNS extrakciójához használjuk fel, 11-12S frakcióként $3\mu 10^9$ sejtől, az 1. példában részletezett lépések szerint.

Kettős szálú cDNS-t szintetizálunk hasonlóképpen, mint az 1. példában és hosszabb, mint 600 bázispárt tartalmazó cDNS-t ($2,4\mu\text{g}$) nyerünk szacharóz sűrűség gradiensen történő frakcionálás után. A cDNS-t ezután dCMP gyökkel kiterjesztjük, terminális dezoxinukleotidil transzferázt alkalmazva és egy 50 ng-os alikvotot forrasztunk össze 250 ng dGMP-vel meghosszabított, PstI-el hasított pBR 322-vel. Az így létrejött hibrid plazmidokat használjuk az *E. coli* K 1776 transzformálására és mintegy 4000 klón transzformánst nyerünk. A Grunstein-Hogness módszer szerint három, 3–16 cDNS plazmiddal (amelyet vizsgáló mintaként használtunk) komplementer klónt szelektálunk ki. Az így szelektált klónok transzformált, emberi IL-2 génnel rendelkező klónok.

5. Példa

Egy plazmidot, amely irányítja a humán IL-2 szintézist *E. coli* sejtben, alakítunk ki a következőképpen: pTIL2-22 plazmidot alakítunk ki pTrS-3-ból (Nishi, T., Taniguchi, T. és munkatársai: SEIKAGAKU 53, 976 (1981)) és IL-2 cDNS-t tartalmazó pIL2-50A-ból egy sor módosítási folyamat segítségével, amint ezt az 5(a) ábra bemutatja. A pTrS-3 plazmid magába foglalja a Trp promotor és a Shine Dalgarno (a továbbiakban SD) terület beiktatását a pBR 322 EcoRI helye és ClaI helye között. A plazmid tartalmaz egy ATG indító kodont is 13 bp-re az SD szekvenciától lefelé, valamint egy egyedi SphI helyet, amint ezt a 4. ábra bemutatja. A vektor akkor tudja hatásosan előállítani a szóban forgó fehérjét, amikor az említett fehérjének megfelelő DNS szekvencia éppen az ATG kodontól lefelé levő fázisban van, amely kodont a SphI-el történő emésztés és az ezt követő T4 DNS polimerázzal történő kezelés váltja ki a pTrS-3-ban. Ennél fogva a pTrS-3 plazmidot ($30\mu\text{g}$) elhasítjuk SphI restriktions enzimmel hagyományos módon, majd az egymás után fenollal és kloroformmal történő kezelés után etanolos csapadékot nyerünk ki, majd mindkét végét T4 DNS polimerázos kezeléssel egyenesre alakítjuk. Ez után a DNS-t ($21,4\mu\text{g}$) kinyerjük a korábbiakhoz hasonló módon egymást követő fenolos, majd kloroformos kezeléssel és etanolos kicsapással. Mésrészt $380\mu\text{g}$ IL-2 cDNS-t tartalmazó pIL2-50A-t hasítunk PstI-el és az IL-2 cDNS inzertet agaróz gél elektroforézissel izoláljuk. $11\mu\text{g}$ cDNS inzertet hasítunk el HgiAI-el, kezeljük T4 DNS polimerázzal és a nagyobb méretű DNS $10\mu\text{g-ját}$ izoláljuk agaróz gél elektroforézissel. Az eljárás szerint egy 132 aminosavat kódoló cDNS-t ($7,2\mu\text{g}$) nyerünk és ez a DNS fragmens levágott végekkel rendelkezik (5(a) ábra). Ez után az így nyert cDNS-t összekapcsoljuk egy pTrS-3 vektorral, amelyet korábban SphI-el emésztettünk és T4 DNS polimerázzal kezeltünk,

éppen az ATG szekvenciától lefelé. Az így összekapcsolt plazmidot alkalmazzuk azután az *E. coli* HB 101 transzformálására a hagyományos eljárások szerint. Az összekapcsolást a következő módon végezzük: IL-2 cDNS ($0,4\mu\text{g}$) nagyobb fragmenst és $0,2\mu\text{g}$ pTrS-3 vektor DNS-t összekeverünk $0,8$ egység T4 DNS ligázzal 66 mmol/literes Tris-HCl oldatban (pH 7,5), amely $6,6\text{ mmol/liter}$ MgCl_2 -t, 1 mmol/liter ATP-t és 10 mmol/liter DTT-t tartalmaz, és a keveréket reagálni hagyjuk egy éjszakán át 4°C hőmérsékleten. Az ampicillint tartalmazó L-tápanyag - agaron megjelenő transzformánsok közül 132 aminosavat kódoló IL-2 cDNS részt tartalmazó telepeket szelektálunk in situ telep-hibridizációs vizsgálattal. Az így szelektált telepeket tenyésztjük (10 ml) ismét plazmid DNS készítése érdekében lizozinos kezeléssel vagy fagyasztás-felengedtetéssel. A plazmid DNS-t PstI-el és XbaI-el hasítjuk és az így létrejött termékeket agaróz gél elektroforézissel analizáljuk, abból a célból, hogy azonosítsuk a pTIL-2-22-t, amelyben a cDNS a TrS-3 ATG szekvenciájához a helyes orientációban van hozzácsatolva. A pTIL2-22-t tartalmazó *E. coli* HB101-et a mikroorganizmusok szaporításához ismert hagyományos körülmények között tenyésztjük. A sejteket 10 ml X tápközegben növesztjük ($2,5\%$ Bacto-tripton, $1,0\%$ élesztőkivonat, $0,1\%$ élesztőkivonat, $0,1\%$ glükóz, 20 mmol/liter MgSO_4 , amely tartalmaz még $25\mu\text{g/ml}$ streptomocint és $25\mu\text{g}$ ampicillint) 37°C hőmérsékleten egy éjszakán át. Egy ml tápközeg-szuspenziót inokulálunk azonos X tápközegbe (100 ml) és tenyésztünk 37°C hőmérsékleten. Amikor az O. D. $650\mu\text{m}$ -al eléri a mintegy $1,5\text{--}2,0$ értéket, 3-indol-akilsavat (IAA) adagolunk. Három órával az induktor adaglása után a sejteket összegyűjtjük, 20 mmol/liter Tris-HCl pufferral — amely 30 mmol/liter NaCl-t is tartalmaz — mossuk és 8 ml hasonló pufferban felfuszpendáljuk. A Trp promotor hatásosabb ténykedése érdekében induktorokat, pl. IAA-t adunk hozzá $50\mu\text{g/ml}$ végső koncentráció eléréséig. A bakteriális sejtben így előállított fehérjét ultrahang-kezeléssel (0°C , 2 perc) nyerünk ki, vagy lizozimos emésztéssel ($8\mu\text{g}$ lizozim, 0°C , 20 perc), ezt követi három fagyasztás-felengedtetés eljárás egymás után. A jelen eljárás szerint az IL-2-t általában az organizmusokból extraháljuk. Az extrahált IL-2 aktivitás 10 000 és 12 000 egység közötti értékeken mozog. A pTIL2-22-t tartalmazó *E. coli* HB 101 törzset (AJ 12004) FERM-BP 245 befogadási számmal letétbe helyezzük.

6. Példa

IL-2 cDNS-t hordozó pTuIL-2-22 plazmidot alakítunk ki pTuBIP-5-ből (Taniguchi, T. és munkatársai: SEIKAGAKU, 53, 966 (1981)) és pTIL2-22-ből, amelyet az 5. példában mutattunk be, a 7. ábrán látható eljárás segítségével. Egy pTuBIP-5 plazmid magában foglal egy tufB-hez szolgáló promotor beiktat-

tást pBR 322-ben. A plazmid tartalmaz egy egyedi Clal helyet is és ez 2 bp-vel lefelé helyezkedik el az SD szekvenciától, amint ezt a 7. ábra mutatja. Mivel a pTrS-3 tartalmaz egy Clal helyet is az SD szekvencia és az ATG indító kodon között, és mivel ezt a Clal hely a kifejeződésre képes plazmid előállításánál nem roncsolódik el, amint ez az 5. példában is le van írva, nagyon egyszerű helyettesíteni a bakteriális trp promotort a tuFB promotorról úgy, hogy az IL-2 cDNS a tuFB promotor ellenőrzése alatt fejeződjék ki.

Ezért a pTIL2-22 plazmidot (30 µg) Clal és PvuII restrikciós enzimekkel hagyományos módon elhasítjuk. Az IL-2 cDNS-t tartalmazó fragmenst (kb 2,2 kb) izoláljuk és agaróz gél elektroforézissel tisztítjuk, így nyerünk ki 3 µg DNS-t. Másrészt 20 µg pTuBIP-5 vektort hasítunk hasonlóképpen Clal-el és PvuII-vel, és az ampicillin rezisztencia gént tartalmazó nagyobb fragmenst (kb 3,4 kb) izoláljuk és agaróz gél elektroforézissel tisztítjuk, így nyerünk ki 3,5 µg DNS-t. Ez után az így kinyert két fragmenst, vagyis a tuFB promotort tartalmazó fragmenst (kb 3,4 kb) és az IL-2 cDNS-t tartalmazó fragmenst (kb 2,2 kb) a következő módon kapcsoljuk össze: 1,2 µg IL-2 cDNS-t tartalmazó fragmenst és 0,3 µg tuFB promotort tartalmazó fragmenst összekeverünk 0,8 egység T4 DNS ligázzal 66 mmól/literes Tris-HCl-ben (pH 7,5), amely 6,6 mmól/liter MgCl₂-t, 1 mmól/liter ATP-t és 10 mmól/liter DTT-t tartalmaz, és a keveréket reagálni hagyjuk egy éjszakán át. Az így összekapcsolt plazmidot használjuk azután az *E. coli* HB 101-be történő transzformálásra a hagyományos eljárás szerint. Az ampicillint tartalmazó L-tápközeges agar lemezen megjelenő transzformánsok közül 8 olyan telepet izolálunk, amely tartalmaz IL-2 cDNS részt, mint pl. a pTuIL2-22 a 7. ábrában, ezekből az 5. példában leírt módon plazmid DNS-t preparálunk ki. A pTuIL2-22-t tartalmazó *E. coli* HB 101 törzset L-tápközegben (100 ml) tenyésztjük 37°C hőmérsékleten. Amikor az O. D. 650 m μ -nál mintegy 0,5–1,0 lesz, a bakteriális sejteket összegyűjtjük, 20 mmól/literes, 30 mmól/liter NaCl-t tartalmazó Tris-HCl pufferral mossuk és ugyanennek a puffernak 2 ml-ében felfuszpendáljuk. Az előállított fehérjét hasonlóképpen vonjuk ki, mint ahogyan ez az 5. példában történt. A kivont IL-2 aktivitás 6,000 és 56,000 egység/ml között van.

A pTuML2-22-t tartalmazó *Escherichia coli* HB 101 törzset (AJ 12010) FERM-BP 246 befogadási számmal letétbe helyeztük.

7. Példa

IL-2 cDNS-t hordozó pGIL2-22 plazmidot alakítunk ki pGL 101-ből (Roberts, T. M. és Laucer, G. D.: Meth. Enzym. 68, 473–483 (1979)) és pTIL2-22-ből, az 5. ábrában bemutatott eljárás szerint.

Egy *lac* promotort tartalmazó pGL 101 plazmidot (20 µg) hasítunk el PvuII restrik-

ciós enzimmel hagyományos módon, és előbb fenolos kezelés, majd kloroformos kezelés, végül etanolos kicsapás után 17 µg DNS-t nyerünk ki. Másrészt pTIL2-22-t (75 µg) hasítunk el Clal-el és Sall-el, és agaróz gél elektroforézissel 2,2 µg IL-2 cDNS-t tartalmazó DNS fragmenst nyerünk ki. A fragmenst DNS polimeráz I-el (Klenow-fragmens) történő kezeléssel egyenesre alakítjuk, majd az így nyert két fragmenst (0,25 µg és 0,66 µg) összekapcsoljuk 1 egység T4 DNS ligázzal hasonló módon, ahogyan ezt a 6. példában tettük. Az így összekapcsolt plazmidot használjuk azután az *E. coli* HB 101 transzformálására hagyományos módszer szerint. A transzformánsok közül az IL-2 cDNS-t tartalmazó Clal–Sall fragmens beiktatással rendelkező transzformánsok a vizsgálandó minták. Ezeket a transzformánsokat tenyésztjük azután 10 ml, 25 µg/ml ampicillint tartalmazó X tápközegben és a plazmid DNS-t az 5. példában leírt módon nyerjük ki. Így egy, a *lac* promotortól éppen lefelé levő IL-2 cDNS ATG indító szekvenciával rendelkező plazmid DNS-t nyerünk PstI-el és Xba-val történő hasítással.

Az így készített pGIL2-22-t 100 ml, 25 µg/ml ampicillint és 25 µg/ml streptomint tartalmazó L-tápközegben inokuláljuk és tenyésztjük. Amikor az optikai sűrűség 65 m μ -nál mintegy 0,5 lesz, izopropil- β -D-tiogalaktopiranozidot (IPTG) adunk hozzá 1 mmól/liter koncentrációban, egy órával később a bakteriális sejteket összegyűjtjük és a sejt-extraktumot a 6. példában leírt módon állítjuk elő. A kiextrahált IL-2 aktivitás 6,000 és 80,000 egység között van.

A pGIL2-22-t tartalmazó *Escherichia coli* HB 101 törzset (AJ 12011) letétbe helyeztük FERM-BP 247 bevételi számon.

8. Példa

pTrS-3 plazmidot (10 µg) először elhasítunk Sall restrikciós enzimmel és a Sall helyet egyenesre alakítjuk DNS polimerázzal (Klenow-fragmens) vagy T4 DNS polimerázzal történő kezeléssel. Clal-el történő hasítás után a trp promotor területet tartalmazó nagyobb fragmenst agaróz gél elektroforézissel izoláljuk hagyományos módon, 3 µg DNS-t nyerve ki.

Másrészt 11 µg, a pIL2-50A PstI-es hasításával nyert cDNS inzertet HgiAI-el elhasítjuk. T4 DNS polimerázzal kezeljük és a nagyobb fragmenst agaróz gél elektroforézissel izoláljuk és tisztítjuk. Így az IL-2 132 aminosavát kódoló cDNS fragmenst nyerjük ki 7,2 µg mennyiségben. Ez után 0,45 µg trp promotort tartalmazó fragmenst (lásd fentebb), 0,5 µg IL-2 cDNS-t tartalmazó HgiAI-PstI fragmenst és szintetikus oligonukleotidokat (20–20 p mól), úgy mint (5') CGATAAGCTATGGCA (3') és (3') TATTCGATACCGT (5') mindkettő foszforilezve az 5'-terminálisnál, ahogyan ezt az 5. példában leírtuk (lásd 5(b) ábra).

Az így összekapcsolt plazmidot használjuk az E. coli HB 101 transzformálására. A megjelenő transzformánsok közül a célnak megfelelő transzformánsokat a következő módon szelektáljuk.

A mind az IL-2 cDNS-t, mind a szintetikus oligonukleotidokat hibridizálni képes transzformáns-jelölteket először telep-hibridizációs módszerrel szelektáljuk, majd a 2(a) ábrában 111–113 helyeknél levő CCT szekvenciával induló (CCTACT.....) DNS fragmens beiktatásával rendelkező, ATGGCA szekvenciától éppen lefelé levő transzformánsokat PstI, XbaI hasítással szelektáljuk.

A fenti transzformánsokat, amelyek pTIL2-21a-t vagy pTIL-2-21b-t tartalmaznak, L-tápközegben tenyésztjük hasonló módon, ahogyan ezt az 5. példában bemutattuk, és nagy IL-2 aktivitás található a transzformánsok sejt-extraktumában, amikor azt az 5. példában leírt módon mérjük.

A pTIL2-2/a-val rendelkező Escherichia coli HB 101 törzset (AJ 12013) és a pTIL2-2/b-vel rendelkező Escherichia coli HB 101 törzset (AJ 12014) letétbe helyezzük FERM-BP 1248, illetve FERM BP 249 bevételi számmon.

A fenti példákban alkalmazott E. coli K 1776 és HB 101 törzsek (Boyer, H. W. és munkatársai: J. Mol. Biol. 41, 459 (1969)) ismertek és bárki számára hozzáférhetők. Ezen kívül a gazdaszervezeteket ki lehet nyerni a letétbe helyezett transzformánsokból is olyan módon, hogy a transzformánsokat L-tápközegben tenyésztjük 37°C hőmérsékleten, hogy elbocsássa az idevonatkozó rekombináns DNS-eket a transzformánsban, és kiválasztjuk azokat a törzseket, amelyek érzékenyvé válnak tetraciklinre és ampicillinre éppen úgy, mint a gazdaszervezet.

A pBR322 plazmid (amely kereskedelmi forgalomban is kapható pl. a Bethesda Research Laboratory-nál), valamint a pCE-1, PtrS-3 és pGL 101 plazmidok mind ismertek és bárki számára rendelkezésre állnak. Ezen kívül a plazmid vektorokat ki lehet nyerni a letétbe helyezett transzformánsokból is olyan módon, hogy a rekombináns plazmid DNS-t a transzformánsból hagyományos módon elkülönítjük, vagy a plazmid vektorokat olyan módon különítjük el, amely természetesen nyilvánvaló a megfelelő példákban levő kitanítások alapján. Így pl. pCE-1-et ki lehet nyerni a pCEIL-2 PstI-el történő emésztésével és a képződött nagyobb DNS fragmens elkülönítésével. Ezen kívül a pTrS-3 és pTuBIP-5 letétbe van helyezve mint E. coli FERM-P 6735, illetve E. coli ATCC 31878.

A találmány jelen leírása után azok, akik ezen a téren járatosak, megérthetik, hogy ugyanezt el lehet végezni a különböző feltételek, paraméterek széles és egyenértékű skálájában anélkül azonban, hogy ez a találmány szellemét és hatáskörét, vagy ezek bármilyen megvalósulását befolyásolná.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás interleukin-2 (IL-2) mRNS előállítására, *azzal jellemezve*, hogy humán T-limfocita, transzformált humán T-limfocita vagy humán T-sejt hibridoma sejtekből vagy ezek tenyészetéből RNS-t állítunk elő, ebből oligo(dT) cellulózon és szacharóz sűrűség gradiens centrifugálással az mRNS-t dúsítjuk (Elsőbbsége: 1982.12.15.)

2. Eljárás interleukin-2 (IL-2) aktivitással rendelkező polipeptidet kódoló gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1. igénypont szerinti eljárással előállított mRNS segítségével egyszálú, majd kétszálú cDNS-t készítünk, ezt megfelelő vektorba iktatva E. coli-ba transzformáljuk, a transzformánsokból plazmidokat állítunk elő, az IL-2 génnel rendelkező plazmidokat IL-2 mRNS-sel hibridizálva kiválasztjuk, és a plazmidokból az IL-2 aktivitással rendelkező peptideket kódoló gént megfelelő restrikciós enzimes emésztéssel kihasítjuk. (Elsőbbsége: 1982.12.24.)

3. A 2. igénypont szerinti eljárás a 2(a) ábrán bemutatott bázisszekvenciával, de annak legalább a 111–113. helyétől legalább az 504–506. helyéig terjedő részével rendelkező gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a hibridizálás után kiválasztott plazmidokkal a megfelelő restrikciós enzimes emésztéssel a tárgyi kör szerinti gént hasítjuk ki. (Elsőbbsége: 1982.12.24.)

4. Az 1. vagy 3. igénypont szerinti eljárás a 2(a) ábra számozása szerinti 48–50. helyénél levő ATG szekvenciával kezdődő és az 504–506. helyénél levő ACT szekvenciával végződő gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a restrikciós enzimes emésztéssel a tárgyi kör szerinti gént hasítjuk ki. (Elsőbbsége: 1982.12.24.)

5. A 2. vagy 3. igénypont szerinti eljárás a 2(a) ábra számozása szerinti 108–110. helyénél levő GCA szekvenciával kezdődő és az 504–506. helyénél levő ACT szekvenciával végződő gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a restrikciós enzimes emésztéssel a tárgyi kör szerinti gént hasítjuk ki. (Elsőbbsége: 1982.12.24.)

6. A 2. vagy 3. igénypont szerinti eljárás a 2(a) ábra számozása szerinti 111–113. helyénél levő CCT szekvenciával kezdődő és az 504–506. helyénél levő ACT szekvenciával végződő gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a restrikciós enzimes emésztéssel a tárgyi kör szerinti gént hasítjuk ki. (Elsőbbsége: 1982.12.24.)

7. A 2. vagy 3. igénypont szerinti eljárás a 2(a) ábra számozása szerinti 1. helyénél levő A bázissal kezdődő és az 504–506. helyénél levő ACT szekvenciával végződő gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a restrikciós enzimes emésztéssel a tárgyi kör szerinti gént hasítjuk ki. (Elsőbbsége: 1982.12.24.)

8. A 2. vagy 3. igénypont szerinti eljárás a 2(a) ábra számozása szerinti 1. helyénél levő

A bázissal kezdődő és az 507—509. helynél levő TGA szekvenciával végződő gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a restrikciós enzimes emésztéssel a tárgyi kör szerinti gént hasítjuk ki. (Elsőbbsége: 1982.12.24.)

9. A 2. vagy 3. igénypont szerinti eljárás a 2(a) ábra számozása szerinti I. helynél levő A bázissal kezdődő és a 801. helynél levő C bázissal végződő gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a restrikciós enzimes emésztéssel a tárgyi kör szerinti gént hasítjuk ki. (Elsőbbsége: 1982. 12. 24.)

10. A 2. vagy 3. igénypont szerinti eljárás a 2(a) ábra szerinti, poli(A) szekvenciával végződő gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a restrikciós enzimes emésztéssel a tárgyi kör szerinti gént hasítjuk ki. (Elsőbbsége: 1982. 12. 24.)

11. A 2. igénypont szerinti eljárás a 2(b) ábrán bemutatott I. aminosavszekvenciával rendelkező gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a restrikciós enzimes emésztéssel a tárgyi kör szerinti gént hasítjuk ki. (Elsőbbsége: 1982. 12. 24.)

12. A 2. igénypont szerinti eljárás a 2(b) ábrán bemutatott II. aminosavszekvenciával rendelkező gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a restrikciós enzimes emésztéssel a tárgyi kör szerinti gént hasítjuk ki. (Elsőbbsége: 1982. 12. 24.)

13. A 2. igénypont szerinti eljárás a 2 (b) ábrán bemutatott III. aminosavszekvenciával rendelkező gén előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a restrikciós enzimes emésztéssel a tárgyi kör szerinti gént hasítjuk ki. (Elsőbbsége: 1982. 12. 24.)

14. Eljárás interleukin (IL-2) aktivitással rendelkező polipeptidet kódoló gén kifejezésére alkalmas rekombináns DNS előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely, a 2—13. igénypontok bármelyike szerinti eljárással előállított gént *Escherichia nemzetségbe* tartozó törzsben vagy állati szövettényészetben sokszorozódni képes vektor DNS-be építjük olyan módon, hogy az említett gén a vektor promotor szekvenciájától lefelé helyezkedjék el. (Elsőbbsége: 1982. 12. 15.)

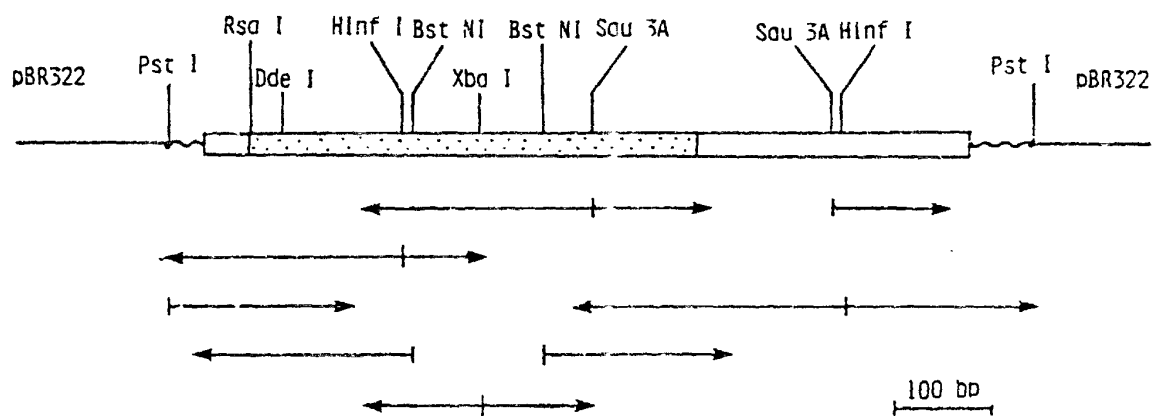
15. Eljárás interleukin-2 (IL-2) gént kifejezni képes, *Escherichia nemzetségbe* tartozó vagy állati szövettényészet transzformáns sejt előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely, a 14. igénypont szerinti eljárással előállított rekombináns DNS vektorral *Escherichia nemzetségbe* tartozó törzset vagy állati szövettényészetet transzformálunk. (Elsőbbsége: 1983. 02. 03.)

16. Eljárás interleukin-2 hatású fehérjék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely, a 15. igénypont szerinti eljárással előállított, *Escherichia nemzetségbe* tartozó transzformánst megfelelő tápközegben tenyésztjük, és a keletkezett interleukin-2 hatású fehérjéket a tápközegből elkülönítjük. (Elsőbbsége: 1982. 12. 27.)

17. Eljárás interleukin-2 hatású fehérjék előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely, a 15. igénypont szerinti eljárással előállított állati szövettényészet transzformánst megfelelő tápközegben tenyésztünk, és a keletkezett interleukin-2 hatású fehérjéket a tápközegből elkülönítjük. (Elsőbbsége: 1982.12.29.)

11 lap rajz, 8 ábra

1. ábra



IntCl₄ C 12 N 15/00; C 12 P 21/00.

2(a). ábra

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala
 ATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACCTCAACTCCTGCCACA ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC ATT GCA
 10
 Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu
 CTA AGT CTT GCA CTT GTC ACA AAC AGT GCA CCT ACT TCA AGT TCT ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG
 20
 Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 GAG CAT TTA CTG CTG GAT TTA CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC ACC
 30
 Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu
 AGG ATG CTC ACA TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA GAA CTG AAA CAT CTT CAG TGT CTA GAA
 40
 Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
 GAA GAA CTC AAA CCT CTG GAG GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA AGA CCC AGG
 50
 Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu
 GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT CTG GAA CTA AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA
 60
 Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile
 TAT GCT GAT GAG ACA GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC AGA TGG ATT ACC TTT TGT CAA AGC ATC ATC
 70
 Ser Thr Leu Thr
 TCA ACA CTA ACT TGA TAATTAAGTGCTTCCCACTTAAACATATCAGGCCCTTCTATTATTAAATATTTAAATTTTATATTATT
 80
 GTTGAATGTATGGTTTGCTACCTATTGTAACCTATTATTCTTAATCTTAAACTATAAATATGGATCTTTTATGATTCTTTTGTAAAGCCCT
 90
 AGGGGCTCTAAAATGGTTTCACTTATTTATCCCAAAATATTTATTATTAIGTTGAATGTTAAATATAGTATCTATGTAGATTGGTTAGTAA
 100
 AACTATTT AATAAA TTGATAAATATAAAAAAAAAAAC - poli(A)
 110

Int.Cl. C 12 N 15/00; C 12 P 21/00

2(b). ábra

I. aminosav-szekvencia

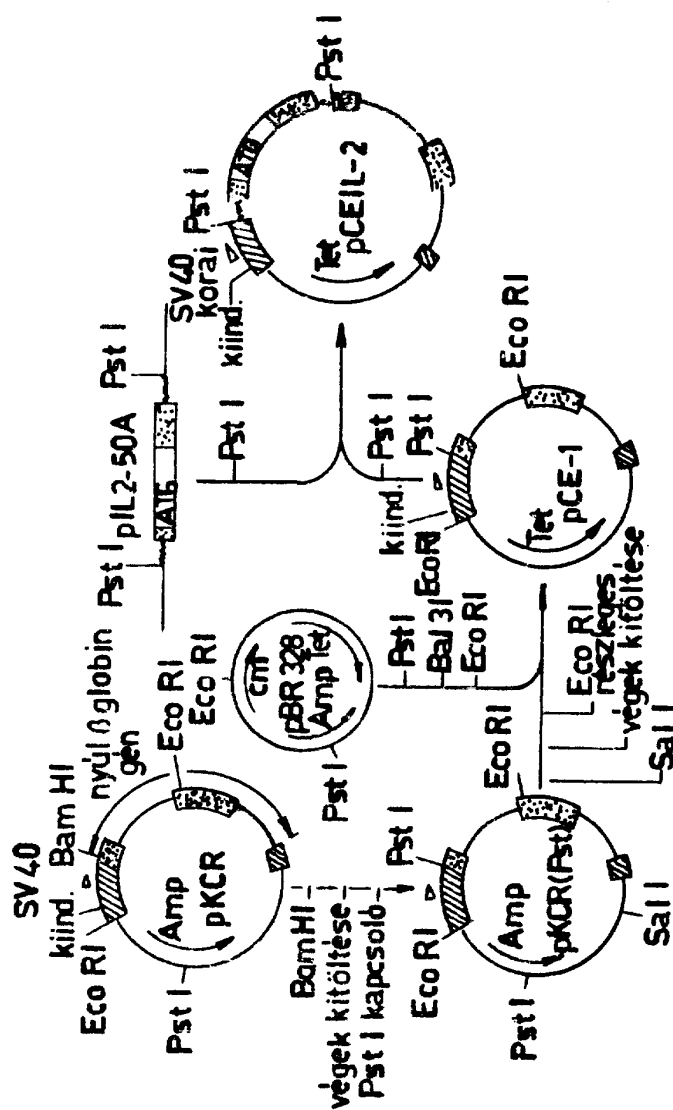
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn
 Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
 Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
 Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His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

II. aminosav-szekvencia

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

III. aminosav-szekvencia

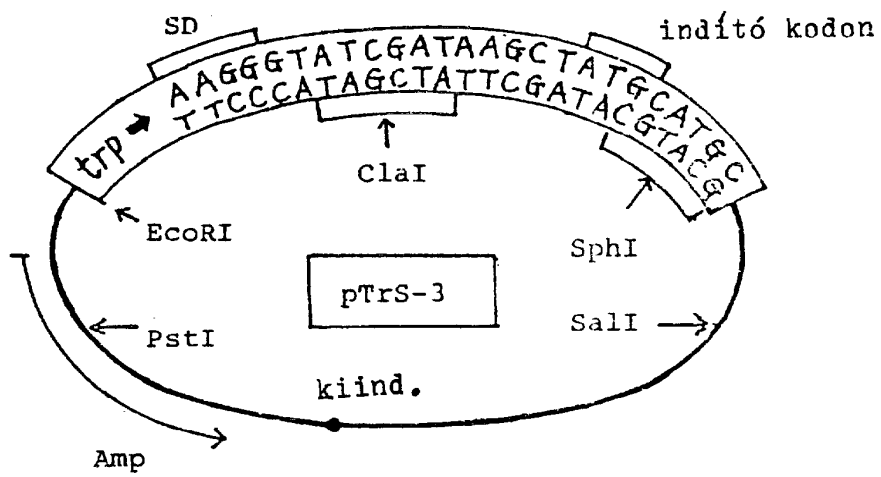
Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
 Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met
 Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys
 Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys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



3. ábra

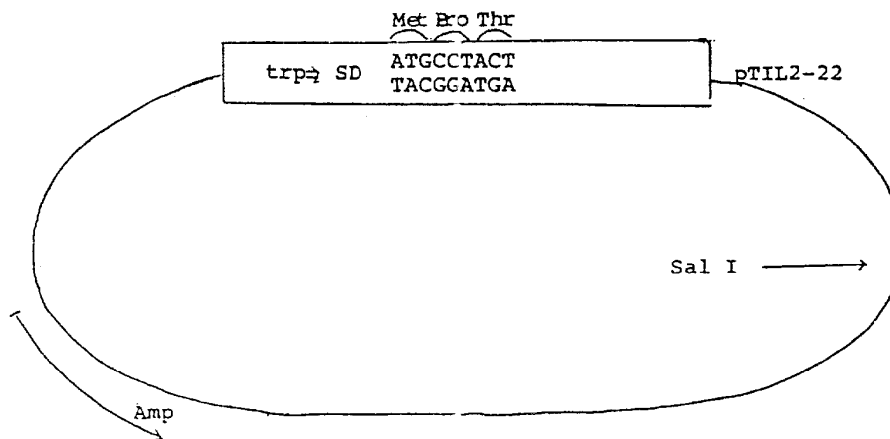
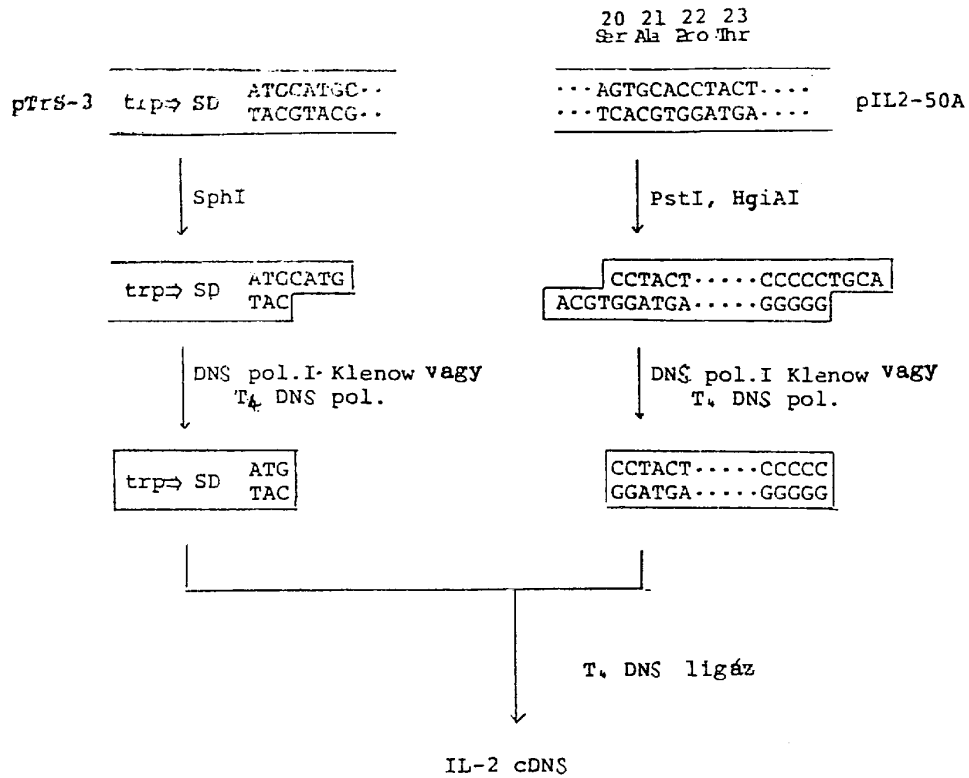
Int.Cl₄ C 12 N 15/00; C 12 P 21/00.

4. ábra

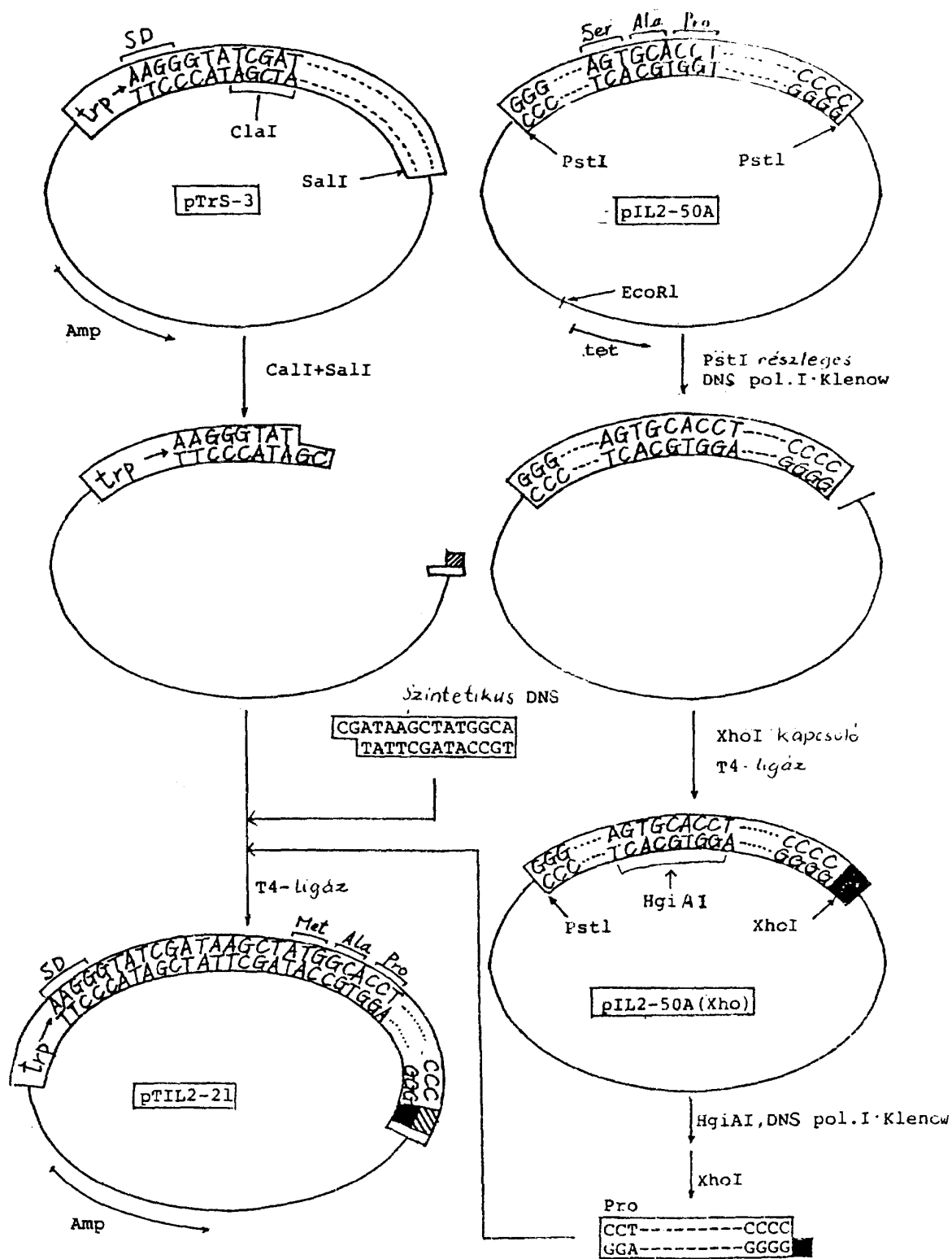


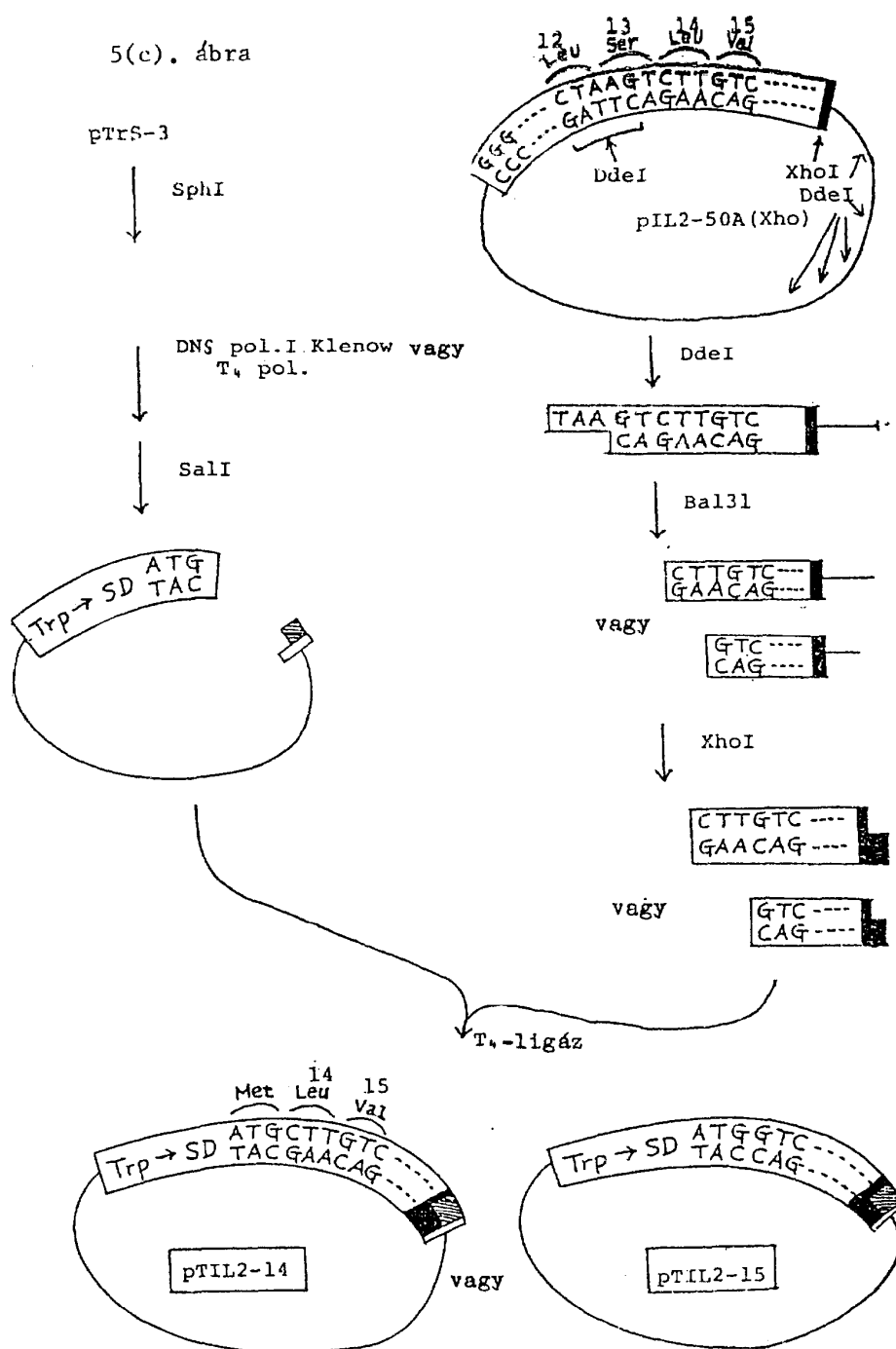
Int.Cl₄ C 12 N 15/00; C 12 P 21/00.

5(a). ábra



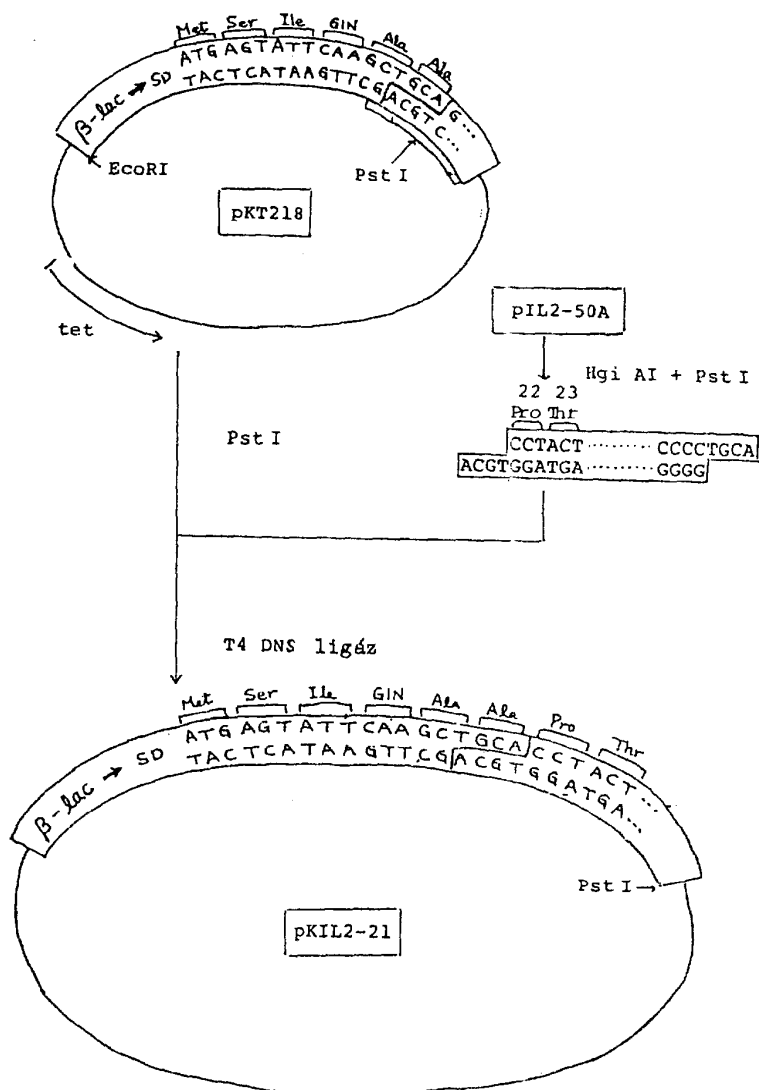
5(b). ábra



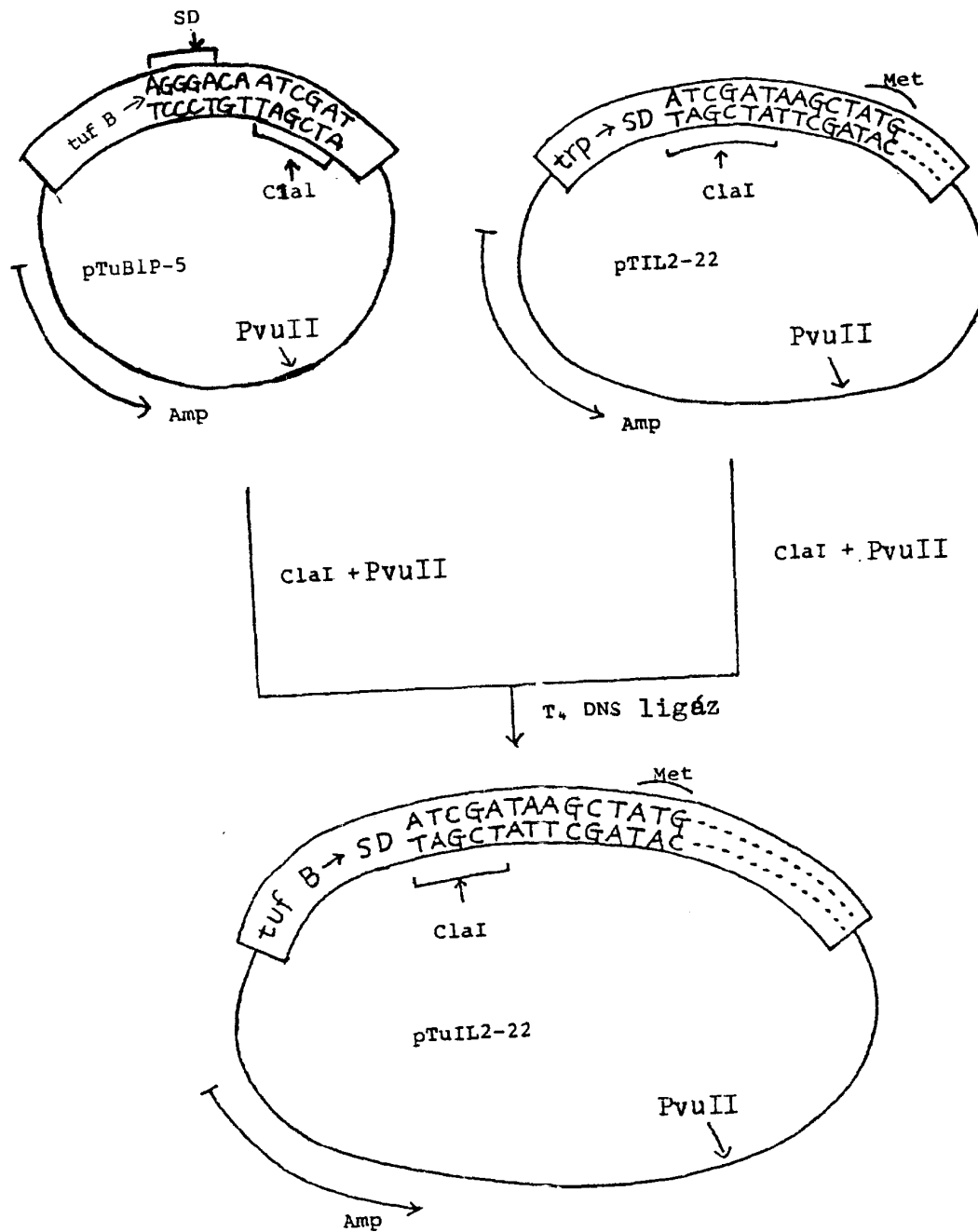


Int.Cl₄ C 12 N 15/00; C 12 P 21/00.

6. ábra

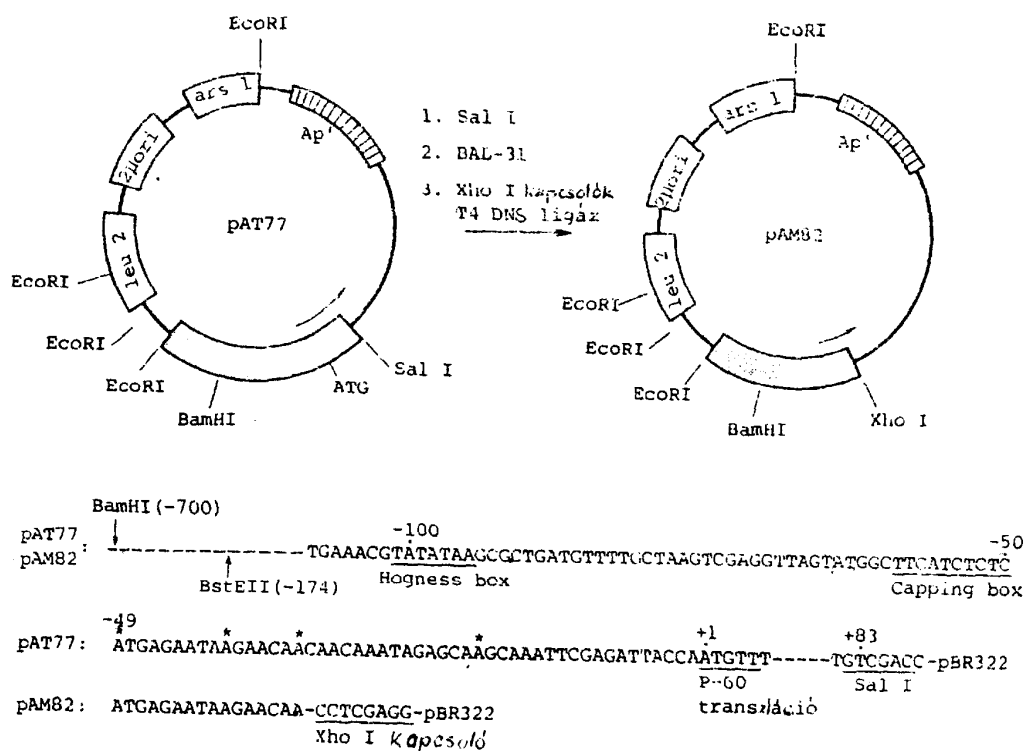


7. ábra



Int.Cl₄ C 12 N 15/00; C 12 P 21/00.

8. ábra



Kiadja: Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető

№ 8501 Nyomdaipari vállalat, Ungvár