

(19) Országkód:

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

203 255 B

- (21) A bejelentés száma: 2457/86
(22) A bejelentés napja: 1986.06.10.
(30) Elsőbbségi adatok:
85/14722 1985.06.11. GB
85/14723 1985.06.11. GB
85/14724 1985.06.11. GB
85/14725 1985.06.11. GB
85/14726 1985.06.11. GB

(51) Int. Cl.⁵

C 12 N 15/21

A 61 K 37/66

- (40) A közzététel napja: 1987.05.28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 1991.06.28. SZKV 91/06

(72) Feltalálók:

Dr. Grütter, Markus Gerhard, Hochwald (ch)
Dr. Hinnen, Albert, Bazel (ch)
Dr. Meister, Andreas, Riehen (ch)
Dr. Meyer, Francois, Zürich (ch)
Dr. Alkan, Sefik, Riehen (CH)

(73) Szabadalmas:

Ciba-Geigy Ag., Bazel (CH)

(54)

Eljárás hibrid interferonok előállítására

(57) KIVONAT

A találmány szerinti eljárással új hibrid interferonok állíthatók elő, amelyek az interferon alfaB, illetőleg alfaD csoporthoz tartozó alfa-2 és alfa-3 limfoblasztoid interferonokból származtathatók le.

Az új hibrid interferonok gyógyszerkészítmények hatóanyagaként való alkalmazása ugyancsak a találmány tárgyát képezi.

HU 203 255 B

A leírás terjedelme: 32 oldal (ezen belül 5 ábra)

A találmány tárgya új hibrid interferonok rekombináns DNS-technológiával mikrobiológiai úton való előállítása, továbbá ezen új interferonoknak az alkalmazása vírusbetegségek és neoplazmás betegségek kezelésénél.

A különböző mitogének és vírusok hatásának kitett eukarióta sejtek sokasága által szekretált interferonok (INF-ek) egy polipeptid családot alkotnak. Az interferonokat kémiai és biológiai jellemzőik alapján három csoportba osztják be: IFN- α , IFN- β és IFN- γ . Az IFN- α és IFN- β gének főként olyan sejtekben fejeződnek ki, amelyeket vírusokkal, vírus alkotórészekkel és ket-tősszállú RNS-sel kezelnek. Ezzel szemben az IFN- γ mitogénekre adott válaszként szintetizálódik.

A humán IFN- α -t egy legalább 15 nem allél-típusú génből álló géncsalád kódolja. Az IFN- β -t és IFN- γ -t egyedüli gének kódolják. Az IFN- α elsődleges transzlációs terméke 189 aminosavból áll (kivéve az IFN- α_2 -t, amely 188 aminosavat tartalmaz), amelyből a 23 aminosavból álló szignál peptidet a transzlációt követő módosítással távolítják el. A 187, illetve 186 aminosavból álló IFN- β -ból, illetve IFN- γ -ból a 21, illetve 20 aminosavat magába foglaló szignál peptidet kell eltávolítani. Az IFN- α szubtypusok aminosav szekvenciájának homológiája 80–85%-os, míg az IFN- β és IFN- α közti homológia körülbelül 30–40%-os. Az IFN- γ csak egyes aminosavaknál mutat az IFN- α -val homológiát, amely azt jelenti, hogy körülbelül 12%-ban vannak azonos csoportjaik.

Az IFN-ek vírusellenes, immun-moduláns, valamint citotoxikus hatást fejtenek ki. Kimutatták, hogy az IFN- α szubtypusoknak (például IFN- α_2 , IFN- α_1) különbözik a célsejt specificitásuk. Az IFN- α_2 és IFN- α_1 antivirális aktivitása közel azonos marhasejtek esetében (MDBK), de az IFN- α_2 kétszer hatásosabb az IFN- α_1 -nél humán sejtek esetében (WISH) és harmincszor kisebb a protektív hatása, mint az IFN- α_1 -nek egérsejtek esetében (L-929), [M. Streuli és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 2848 (1981)]. Azt a tényt, hogy a sokgénés IFN- α családtagok vírusellenes aktivitásának mértéke és specificitása különböző, bizonyos IFN- α „hibridek”-kel kapott eredmények erősítették meg (32134 számú európai szabadalmi bejelentés; 4414150 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás). Ezeket a „hibrid”-eket úgy szerkesztették meg, hogy két interferon- α szubtypust kódoló gént hasítottak PvuII restrikciós enzimmel (vagy két esetben BglII-vel) és a keletkező fragmentumokat úgy kapcsolták össze ligázzal, hogy az egyik IFN gén amino-terminálisát kódoló DNS-szekvencia a másik IFN gén karboxi-terminálisát kódoló DNS-szekvenciával fuzionált. Bár ezek a hibridek interferonok célsejt specificitásukban – összehasonlítva őket a szülői interferonokkal – változást mutatnak, azonban nem volt kimutatható, hogy gyengült vagy csökkent volna a háromfajta interferonaktivitás bármelyike is. Bizonyos csökkenés vagy korlátozás azonban kívánatos lehet, például klinikai alkalmazás esetén, amikor egyetlen problémára, például vírusfertőzésre volna szükséges összpontosítani az interferonte-

rápiát, mégpedig úgy, hogy ne keletkezhessenek komplikációs faktori az alkalmazott interferon más irányú hatásai következtében.

- Ennélfogva a jelen találmány egyik tárgyát olyan új hibrid interferonok képezik, amelyek sokkal specifikusabb biológiai aktivitást fejtenek ki egyetlen – interferon által indukált – biokémiai folyamat szelektív és uralkodó aktiválódása következtében és/vagy azért, hogy a természetes interferonok bizonyos nemkívánatos olyan mellékhatásai, amelyek használatukat korlátozzák, ilyenek az influenzaszerű tünetek (például láz, fejfájás és fáradtság), a gyomor-, bélzavarok, vérnyomásesés, hajhullás, eltűnnek vagy csökkennek.

- A találmány szerint előállított hibrid interferonok humán limfoblasztoid interferonokból származnak: a LyIFN- α -2-ből, melynek szekvenciája a következő:

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR
LYS ASP SER SER ALA ALA LEU ASP GLU THR
LEU LEU ASP GLU PHE TYR ILE GLU LEU ASP
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU SER CYS VAL
MET GLN GLU VAL GLY VAL ILE GLU SER PRO
LEU MET TYR GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL
ARG LYS TYR PHE GLN ARG ILE THR LEU TYR
LEU THR GLU LYS LYS TYR SER SER CYS ALA
TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET
ARG SER PHE SER LEU SER ILE ASN LEU GLN
LYS ARG LEU LYS SER LYS GLU.

- valamint a LyIFN- α -3-ből, amelynek szekvenciája az alábbi:

CYS ASP LEU PRO LEU THR HIS SER LEU ASP ASN
ARG ARG THR LEU MET LEU LEU ALA GLN
MET SER ARG ILE SER PRO SER SER CYS LEU
MET ASP ARG HIS ASP PHE GLY PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP GLY ASN GLN PHE GLN LYS
ALA PRO ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU LEU
ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR
LYS ASP SER SER ALA ALA TRP ASP GLU ASP
LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
MET GLN GLU GLU ARG VAL GLY GLU THR
PRO LEU MET ASN ALA ASP SER ILE LEU ALA
VAL LYS LYS TYR PHE ARG ARG ILE THR LEU
TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS
ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE
MET ARG SER LEU SER LEU SER THR ASN LEU
GLN GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU.

- Ezeket az interferonokat és előállításuk módszereit a 76489 számú európai szabadalmi bejelentés tartalmazza. A LyIFN- α -2 rokonságban van (de nem azonos vele) a humán leukocita LeIF- α B interferonnal

(4414150 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmileírás) és specifikus aktivitása primer borjúvesesejtekre $1,85 \cdot 10^8$ E/mg, illetve humán magzati bőr sejtekre (HEF=human embryonic foreskin; vezikuláris stomatitis vírussal fertőzött sejtek) $2,45 \cdot 10^8$ E/mg. A LyIFN- α -3 rokonságban van (de nem azonos vele) a humán leukocita LeIF- α D interferonnal (4414150 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírás) és specifikus aktivitása borjúsejtekre és HEF-sejtekre (lásd fent) $1,32 \cdot 10^8$ E/mg, illetve $3,7 \cdot 10^6$ E/mg. A LyIFN- α -3-nak ezenkívül jobb a hőstabilitása és kisebb az antiproliferatív aktivitása, mint a LyIFN- α -2-nek.

A találmány különösen olyan hibrid interferon polipeptidek előállítására vonatkozik, amelyek aminosav szekvenciája kettő-négy olyan al-szekvenciából tevődik össze, melyek az aminosavak azonosságát és számát illetően megfelelnek a LyIFN- α -2 és LyIFN- α -3 humán limfoblasztoid interferon al-szekvenciáinak. Az eljárásra az jellemző, hogy prokarióta vagy élesztő gazdasejteket transzformálunk egy hibrid vektorral, amely egy promoterből és egy DNS-szekvenciából áll – amely egy hibrid interferon polipeptidet kódol és ez a polipeptid a következők egyike: polipeptid, melynek aminosav szekvenciája a LyIFN- α -2 1–150 aminosavából és a LyIFN- α -3 151–166 aminosavából áll; polipeptid, melynek aminosav szekvenciája a LyIFN- α -2 1–92 aminosavából, a LyIFN- α -3 93–150 aminosavából és a LyIFN- α -2 151–166 aminosavából áll; polipeptid, melynek aminosav szekvenciája a LyIFN- α -1 1–60 aminosavából, a LyIFN- α -3 61–92 aminosavából, a LyIFN- α -2 vagy a LyIFN- α -3 93–150 aminosavából és a LyIFN- α -2 vagy LyIFN- α -3 151–166 aminosavából áll.

A DNS-szekvenciát a promoter határozza meg. A vektor DNS-t tenyésztjük, a hibrid interferont elkülönítjük és kívánt esetben, gyógyszerkészítmény előállítására a kapott hibrid interferont gyógyászati szempontból elfogadható vívőanyaggal és/vagy adalékanyaggal keverjük össze.

Még részletesebben, a találmány a következő hibrid interferonok előállítására vonatkozik:

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR
LYS ASP SER SER ALA ALA LEU ASP GLU THR
LEU LEU ASP GLU PHE TYR ILE GLU LEU ASP
GLN GLN LEU ASP ASP LEU GLU SER CYS VAL
MET GLN GLU VAL GLY VAL ILE GLU SER PRO
LEU MET TYR GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL
ARG LYS TYR PHE GLN ARG ILE THR LEU TYR
LEU THR GLU LYS LYS TYR SER SER CYS ALA
TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET
ARG SER LEU SER LEU SER THR ASN LEU GLN
GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU

– az (I) szerkezetű „B₁B₂D₃B₄” hibrid interferon,

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR
LYS ASP SER SER ALA ALA LEU ASP GLU THR
LEU LEU ASP GLU PHE TYR ILE GLU LEU ASP
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
MET GLN GLU GLU ARG VAL GLY GLU THR
PRO LEU MET ASN ALA ASP SER ILE LEU ALA
VAL LYS LYS TYR PHE ARG ARG ILE THR LEU
TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS
ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE
MET ARG SER PHE SER LEU SER ILE ASN LEU
GLN LYS ARG LEU LYS SER LYS GLU

– az (II) szerkezetű „B₁D₂B₃D₄” hibrid interferon,

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR
LYS ASP SER SER ALA ALA TRP ASP GLU ASP
LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU SER CYS VAL
MET GLN GLU VAL GLY VAL ILE GLU SER PRO
LEU MET TYR GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL
ARG LYS TYR PHE GLN ARG ILE THR LEU TYR
LEU THR GLU LYS LYS TYR SER SER CYS ALA
TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET
ARG SER LEU SER LEU SER THR ASN LEU GLN
GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU

– az (III) szerkezetű „B₁D₂D₃B₄” hibrid interferon,

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR
LYS ASP SER SER ALA ALA TRP ASP GLU ASP
LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
MET GLN GLU GLU ARG VAL GLY GLU THR
PRO LEU MET ASN ALA ASP SER ILE LEU ALA
VAL LYS LYS TYR PHE ARG ARG ILE THR LEU
TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS
ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE
MET ARG SER PHE SER LEU SER ILE ASN LEU
GLN LYS ARG LEU LYS SER LYS GLU

– a (IV) szerkezetű „B₁D₂D₃D₄” hibrid interferon,

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR
LYS ASP SER SER ALA ALA TRP ASP GLU ASP
LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
MET GLN GLU GLU ARG VAL GLY GLU THR
PRO LEU MET ASN ALA ASP SER ILE LEU ALA
VAL LYS LYS TYR PHE ARG ARG ILE THR LEU
TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS
ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE
MET ARG SER LEU SER LEU SER THR ASN LEU
GLN GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU

– az (V) szerkezetű „B₁D₂B₃B₄” hibrid interferon és

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR
LYS ASP SER SER ALA ALA TRP ASP GLU ASP
LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU SER CYS VAL
MET GLN GLU VAL GLY VAL ILE GLU SER PRO
LEU MET TYR GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL
ARG LYS TYR PHE GLN ARG ILE THR LEU TYR
LEU THR GLU LYS LYS TYR SER SER CYS ALA
TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET
ARG SER PHE SER LEU SER ILE ASN LEU GLN
LYS ARG LEU LYS SER LYS GLU

– a (VI) szerkezetű „B₁B₂D₃B₄” hibrid interferon.

A legelőnyösebb találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferon a „B₁D₂D₃D₄” (V) és a „B₁B₂D₃B₄” (VI).

Egy találmány szerinti hibrid interferon a találmány szerinti eljárással rekombináns DNS-technikával állítható elő, mely például a következő lépésekből áll:

a) a szóban forgó hibrid interferont kódoló strukturális gént tartalmazó DNS előállítás a LyIFN- α -2 és LyIFN- α -3 interferon 60, 92, illetve 150. aminosavának megfelelő helyeken in vitro rekombinációval, vagy a DNS kémiai úton való szintézise és ezután a kapott DNS beépítése egy megfelelő kifejező vektorba;

b) a hibrid IFN strukturális génjét hordozó vektor bevitele egy recipiens gazdasejtbe;

c) a transzformált gazdasejtek elválasztása a nem transzformálódott sejtektől, rendszerint olyan tenyésztési körülmények révén, melyekben csak a transzformált sejtek a túlélők;

d) a transzformált gazdasejtek tenyésztése olyan körülmények mellett, amelyek elősegítik a hibrid IFN strukturális génjének a kifejeződését és

e) a kifejeződött hibrid IFN izolálása.

Az alkalmazott módszereket a következő részletes leírás és a csatolt ábrák fogják leginkább megvilágítani.

Az alábbiakban ismertetjük az ábrákat:

Az 1. ábra az érett LyIFN- α -3 és LyIFN- α -3 aminosav szekvenciáját hasonlítja össze. A LyIFN- α -3-ból csak azokat az aminosavakat írtuk le, amelyek a LyIFN- α -2 megfelelő aminosavától különböznek, egyébként aminosavai azonosak a LyIFN- α -2 aminosavaival.

A 2. ábra a LyIFN- α -2 és LyIFN- α -3 kódoló régiójának nukleotid szekvenciáját és 3' extracisztron régiójának részeit mutatja be. Az ATG translációt iniciáló kodonokat, a terminátor tripleteket és az alkalmas restrikciós helyeket aláhúztuk. A kódoló tripleteket megszámoztuk.

A 3. ábra a pHR(AP)/LyIFN- α -2 és a pHR(AP)/LyIFN- α -3 plazmid kis szegmentumainak HidIII-PstI restrikciós térképét ábrázolja. A fehér sáv (LyIFN- α -3), illetve a fekete sáv (LyIFN- α -2) határolja az érett IFN-ek kódoló régióit. Alul az IFN polipeptid (166 aminosav) primer struktúrájának négy részre való tagozódását mutatjuk be. Zárójelben annak az aminosavnak a sorszámát adjuk meg, amelynek tekintetében az α -2 és az α -3 IFN-ek egymástól különböznek.

A 4. és 5. ábrán a hordozóhoz kötött radioaktivitást ábrázoljuk az IFN- α -2 mennyiségének függvényében, melyet a vizsgálandó oldatban szendvics RIA-val mértünk.

1. Hibrid IFN strukturális gént tartalmazó hibrid vektorok előállítása

A humán interferon- α két szubtypusának, az α -2-nek és az α -3-nak a cDNA-ét E.coliba klónozzuk be. A pBR(AP)/LyIFN- α -2 és pBR(AP)/LyIFN- α -3 plazmidban olyan HindII-PstI (vagy EcoRI-PstI) DNS-inszertum van, amely pBR(AP)/LyIFN- α -2-2, illetve LyIFN- α -3 kódoló régióját tartalmazza β -laktamáz promotor szabályozása mellett (lásd a 76489 számú európai szabadalmi bejelentést). Az illető inszertumok restrikciós térképei a 3. ábrán láthatók. Könnyen megállapítható, hogy a génekben közös restrikciós helyek vannak (az IFN aminosav szekvenciájának 60, 92 és 150-edik pozíciójában helyezkednek el); amelyeket előnyösen használhatunk fel kedvező biológiai és/vagy fizikai tulajdonságokkal rendelkező hibrid interferonokat kódoló új gének szerkesztésénél.

Tehát a LyIFN- α -2 és LyIFN- α -3 gének közt úgy keletkezhetnek rekombinánsok (egyszeres vagy többszörös kicserélődések), ha in vitro rekombinálnak a PvuII helyen (92-es pozíció) és/vagy a Sau3A helyeken (60-as és 150-es pozíció). Minthogy ezek szerint az interferonok primer szerkezete négy szakaszra osztható (első szakasz: 1–60 aminosav, második szakasz: 61–92 aminosav, harmadik szakasz: 93–150 aminosav és negyedik szakasz: 151–166 aminosav; lásd a 3. áb-

rát), ezen találmány hibrid interferonjait négy betűvel jelölhetjük, ahol a betűk a jelen lévő szakaszt jelentik. Például: az (I) hibrid interferon a LyIFN- α -2 interferon („B”, ti. a LyIFN- α -2 rokonságban van az IFN- α B-vel, lásd fent) 1–3. szakaszából és a LyIFN- α -3 in-

terferon („D”, ti. a LyIFN- α -3 rokonságban van az IFN- α D-vel, lásd fent) 4. szakaszából tevődik össze, s így IFN „B₁B₂B₃D₄”-nek nevezzük.

Annak érdekében, hogy a kívánt interferon előállítását megkönnyítsük, a LyIFN- α -2-t, illetve a LyIFN- α -3-at kódoló régiókat tartalmazó DNS-inszertumokat úgy kell módosítanunk, hogy a ligázos összekapcsoláshoz csak egyetlen HindIII (vagy EcoRI), PvuII és PstI restrikciós hely legyen bennük. A 3. ábrából kitűnik, hogy a LyIFN- α -2 gén 3'extracisztron régiójában eltávolíthatjuk, például úgy, hogy egy hibrid vektort, amely a LyIFN- α -2 kódoló régióit tartalmazza, részlegesen hasítunk PuvII-vel, a keletkezett linearizált DNS-t összekapcsoljuk egy olyan DNS-szekvenciát tartalmazó linkerrel, amelyet a PstI restrikciós endonukleáz felismer, majd hasítunk PstI-gyel, az emésztett darabokat alacsony DNS-koncentráció mellett, ligáz segítségével összekapcsoljuk, majd azokra a plazmidokra szelektálunk (például restrikciós analízissel), amelyek a kívánt módosulást tartalmazzák, azaz a megrövidített, PvuII helyet nem tartalmazó 3'extracisztron régiót. Ezzel analóg módon előnyösen módosíthatjuk az IFN gének klónozására használt vektorokat úgy, hogy csak egyetlen HindIII, PvuII és PstI restrikciós hely legyen bennük.

A találmány szerinti eljárásban felhasznált hibrid vektorok DNS-szekvenciája az (I)–(VI) szekvenciájú hibrid interferonok valamelyikét kódolja, s az a szekvencia mesterségesen hozzá van kapcsolva egy kifejeződést szabályozó szekvenciához. A találmány tárgyát képezik az ezen hibrid vektorok előállítására irányuló eljárások is.

A vektor kiválasztása a transzformáláshoz szánt gazdasejtől függ. Alkalmas gazdák például azok a mikroorganizmusok, amelyekben nincsenek restrikciós enzimek, vagy modifikáló enzimek, vagy ezekből kevés van bennük, ilyenek az élesztők, például a *Saccharomyces cerevisiae* és egyes baktériumtörzsek, különösen az *E. coli* törzsek, például az *E. coli* X1776, *E. coli* HB101, *E. coli* W3110, *E. coli* HB101/LM1035, *E. coli* Ja221 vagy *E. coli* K12294 törzs, továbbá a *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Streptococcus* és mások, ezenkívül a magasabb fejlődési fokon levő szervezetek sejtjei, különösen az elismert emberi vagy állati sejtvonalak. Az *E. coli* fent említett törzsei, például az *E. coli* HB101 és az *E. coli* JA221, továbbá a *Saccharomyces cerevisiae* kitüntetett gazda mikroorganizmusok.

Elvben minden olyan vektor alkalmas lehet, amelyik replikálódik és kifejezi a hibrid interferon géneket a választott gazdasejtben. Példaként felsorolunk olyan vektorokat, amelyek alkalmasak arra, hogy *E. coli* törzsben kifejezzék a hibrid interferon géneket: bakteriofágok, például a λ bakteriofág származékai, vagy plazmidok,

ilyen különösen a ColE1 plazmid és származékai, például a pMB9, pSF2124, pBR317 vagy pBR322. A jelen találmány előnybe helyezett vektorai a pBR322-ből származnak. A megfelelő vektorok komplett replikont és olyan marker gént tartalmaznak, mely lehetővé teszi az expressziós plazmiddal transzformált gazdasejt szelektálását és azonosítását egy fenotípusos jellemvonás alapján. A megfelelő marker gén olyan tulajdonsággal ruházza fel a gazdasejtet, hogy például rezisztenssé válik nehéz fémekkel, antibiotikumokkal és egyéb ilyen anyagokkal szemben. Ezenkívül, a találmány szerint használható előnyös vektorok, a replikon és a marker gén régiókon kívül restrikciós endonukleázokat felismerő szekvenciákat is tartalmaznak, hogy be lehessen építeni ezekre a helyekre a hibrid IFN gént, és ha van megfelelő, az expressziót szabályozó szekvenciát. Előnyös vektor a pBR322 plazmid, mely inakt replikont és tetraciklinel és ampicillinnel szembeni rezisztenciáért felelős két gént (tet^R és amp^R) tartalmaz, továbbá számos restrikciós endonukleáz számára egyetlen felismerő helyet, ilyen például a PstI (az amp^R génben hasít, a tet^R gén változatlan marad) pBR(AP)/LyIFN- α -2 BamHI, HindIII és SalI (mindhárom a tet^R génben hasít, az amp^R gén érintetlen marad), továbbá a NruI és EcoRI.

Számos expressziószabályozó szekvencia használható a gén kifejeződésének irányítására. A transzformálódó gazdasejtnél különösen azokat az expresszióit szabályozó szekvenciákat használjuk, amelyek magas kifejeződési szintű génekhez tartoznak. Abban az esetben, amikor a pBR322 hibrid vektorként és az *E. coli* gazda mikroorganizmusként szerepel, az alábbi operonok és gén-kifejeződést szabályozó szekvenciák (melyek többek között promotert és riboszóma kötő helyet tartalmaznak) a megfelelőek: laktóz operon, triptofán operon, arabinóz operon és hasonló, a β -laktamáz gén, a λ -fág N génjének megfelelő szekvenciák vagy az fd fág burok protein génje és így tovább. Míg a pBR322 plazmid eleve tartalmazza a β -laktamáz gén (β -lac gén) promotert, addig a többi expressziószabályozó szekvenciát be kell a plazmidba építeni.

Azok a vektorok, amelyek az élesztőben replikálódnak és kifejezés szempontjából megfelelnek, azok élesztő replikációs kezdőpontot és az élesztőre nézve szelektív genetikai markert tartalmaznak. Megfelelnek olyan hibrid vektorok is, amelyekben élesztő replikációs kezdőpont van, például kromoszomális autonóm módon replikálódó szegmentum (ARS = autonomously replicating sequence), s ez a transzformálás után az élesztő sejtben belül a kromoszómán kívül marad és az autonóm módon replikálódik. Ezenkívül azok a hibrid vektorok is használhatók, amelyek az élesztő 2 μ plazmidja DNS-ével homológ szekvenciákat tartalmaznak. Az ilyen hibrid vektorok rekombináció révén integrálódnak a sejtben belül már jelen lévő 2 μ plazmidba vagy autonóm módon replikálódnak a sejtben. Magas transzformációs frekvenciájú és sok másolat számmal működő plazmidok számára különösen alkalmasak a 2 μ szekvenciák. A jelen találmány előnybe helyezett élesztő vektora a pJDB207 plazmid.

Az élesztők számára megfelelő marker gének különösen azok, amelyek a gazdasejtnek antibiotikum rezisztenciát kölcsönöznek vagy az auxotróf élesztő mutánsok esetében azok a gének, amelyek a gazdasejt lézióját teszik teljessé. A megfelelő gének például azok, amelyek a cikloheximid antibiotikummal szembeni rezisztenciát adják át vagy pedig prototróf tulajdonsággal látják el az auxotróf élesztő mutáns, ilyen például az URA3, LEU2, HIS3 vagy különösen a TRP1 gén. A még előnyösebb élesztő hibrid vektorok bakteriális gazdasejtben, különösen az *E. coli*-ban is tartalmaznak replikációs kezdőpontot és marker gént, így a hibrid vektorok és intermedier származékaik szerkesztése és klónozása bakteriális gazdasejtben is megvalósítható.

Élesztőben való kifejeződés szempontjából például azok az alkalmas expressziószabályozó szekvenciák, amelyek magas szinten fejezik ki az élesztő géneket. Ilyen módon használható tehát a TRP1 gén ADHI vagy ADHII gén, savanyú foszfátáz gén (PHO3 vagy PHO5) és izocitokróim gén promoterei, vagy a glükolitikus folyamatban részt vevő promoterek, ilyenek az enoláz, gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH), 3-foszfoglicerát-kináz (CPK), hexokináz, piruvát-dekarboxiláz, foszfo-frukto-kináz, glükóz-6-foszfát-izomeráz, 3-foszfoglicerát-mutáz, piruvát-kináz, trióz-foszfát-izomeráz, foszfo-glükóz-izomeráz és glükókináz gének promoterei. A jelen találmány által előnybe helyezett vektorok transzkripció szabályozással ellátott promotereket tartalmaznak, ilyenek például a PHO5, ADHII és GAPDH gének promoterei, amelyeket be vagy ki lehet kapcsolni a tenyésztési körülmények változtatásával. A PHO5 promotert például be lehet kapcsolni vagy ki lehet kapcsolni azáltal, ha növeljük vagy csökkentjük a táptalaj anorganikus foszfát koncentrációját.

A promotert mesterségesen kapcsoljuk a kódoló régióhoz úgy, hogy az a hibrid interferon kifejeződésének hatékonyságát biztosítsa. A jelen találmány egyik megvalósítási változatában közvetlenül kapcsolódik az érett IFN kódoló szakaszához úgy, hogy a találkozás helyén transzlációs start szignál (ATG) van beépítve. A promoternak a hibrid IFN-t kódoló szakaszhoz kapcsolódásának előnyös régiója a fő mRNS startja és az illető promoterhez természetesen kötött gén ATG-je közt helyezkedik el.

A jelen találmány egy másik kiviteli változatában, különösen, ha gazda-mikroorganizmusként élesztőt alkalmazunk, a szerkezet egy szignál szekvenciát is tartalmaz. Azok az alkalmas szignál szekvenciák, amelyek a használt promoterhez természetesen kapcsolódnak. Felhasználhatjuk például a PHO5 szignál szekvenciát, továbbá az élesztő invertáz vagy α -faktor gének szignál szekvenciáját. Azokat a kombinációkat helyezzük előnybe, amelyek a szignál szekvencia és az érett hibrid IFN aminosav szekvenciája közti pontos hasítást teszik lehetővé. Olyan járulékos szekvenciákat, mint a pro- vagy spacer-szekvenciák, amelyek specifikus processzor szignálokat hordozhatnak, vagy nem hordozhatnak, szintén beépíthetünk a szerkezet-

be olyan célból, hogy megkönnyítsük a prekursor molekulák helyes kezelését. Emellett fuzionált proteinek is termelhetünk belső processzor szignálokkal, amelyek elősegítik a megfelelő érést in vivo vagy in vitro.

A találmány szerinti eljárásban használható vektorok – előnyösen – egy 3'-nél elhelyezkedő olyan gén-szekvenciát is magukba foglalnak, amely megfelelő szignálokat tartalmaz a transzkripció befejezéséhez és a poliadenilációhoz. Az ilyen 3'-nél lévő szekvenciák például azok a gén szekvenciák, amelyek természetesen kapcsolódnak az alkalmazott promoterhez. Abban az esetben, ha gazda-mikroorganizmusként élesztőt használunk, az alkalmazott expressziót szabályozó szekvencia, a PHO5 promotor, akkor előnyös, ha a 3'-t határoló szekvencia a PHO5 géné.

A találmány szerinti eljárás egy előnyös megvalósítási módja esetén a hibrid vektorok egy gazdatörzsben replikációra és fenotípusos szelektálódásra képesek. Ezek magukba foglalnak egy promotert és egy, az új hibrid interferonok valamelyikét kódoló DNS-szekvenciát, s e szóban forgó DNS-szekvencia a transzkripció start és terminátor szignáljával, valamint a transzláció start és stop szignáljával együtt az illető hibrid vektorban található az említett promotor szabályozása alatt oly módon, hogy egy transzformált gazdasejtben kifejeződvén, a találmány szerinti hibrid interferont állítja elő.

A találmány szerinti eljárásban használt hibrid vektorokat előállíthatjuk úgy, hogy a LyIFN- α -2 és LyIFN- α -3 kódoló szakaszainak megfelelő szegmentumokat in vitro ligázzal összekapcsoljuk és a keletkezett hibrid IFN gént megfelelő vektorba juttatjuk be, vagy pedig úgy, hogy egy egyedi IFN DNS-szegmentumot ligázzal összekapcsolunk egy olyan linearizált vektor DNS-sel, amely már tartalmazza a még hiányzó szakaszokat, hogy ilyen módon a kívánt hibrid interferont kódoló gén álljon elő. Előnyös, ha az amino terminális vég-szekvenciát adó DNS-szegmentum már fuzionálódott az expressziószabályozó szekvenciával.

A LyIFN- α -2 és LyIFN- α -3 kódoló régióinak megfelelő szegmentumokat főként a jelen találmány által előnybe helyezett kiindulási vektorból vesszük, azaz a pBR322-ből származó pAM2 és pAM21 plazmidből. A pAM2 plazmid egy HindIII-PstI inszertumot tartalmaz, amely magába foglalja a LyIFN- α -3 kódoló régióját β -laktamáz promotor szabályozása alatt. A pAM2 plazmid vektor része PvuII-vel szemben rezisztens. A pAM21 plazmid egy HindIII-PstI inszertumot tartalmaz, amely magában foglalja a LyIFN- α -2 kódoló régióját – ennek 92-es pozíciójában van az egyetlen PvuII hely – a β -laktamáz promotor szabályozása alatt. A pAM21 plazmid vektor része ugyan-csak rezisztens a PuvII-vel szemben.

A „B₁B₂B₃D₄” hibrid interferont főként úgy állítjuk elő, hogy a pAM21 plazmid nagy PstI-PvuII fragmentumát, a pAM21 plazmid kis Sau3A-PvuII fragmentumát és a pAM2 plazmid kis Sau3A-PstI fragmentumát ligáz segítségével összekapcsoljuk. Ezzel a

szerkesztéssel egy olyan plazmidot (pJC344) kapunk, amely tartalmazza a „B₁B₂B₃D₄” hibrid interferon kódoló szakaszát a β-laktamáz promoter szabályozása mellett. Hasonló módon állítjuk elő a „B₁B₂D₃B₄” hibrid interferont kódoló gént, amikor is a pAM21 plazmid nagy PvuII-PstI fragmentumát, a pAM2 plazmid kis Sau3A-PvuII fragmentumát és a pAM21 plazmid kis Sau3A-PstI fragmentumát kapcsoljuk össze. Ez a szerkezet egy olyan plazmidot (pJC342) eredményez, amely a „B₁B₂D₃B₄” hibrid interferon kódoló régióját tartalmazza a β-laktamáz promoter szabályozása alatt. A „B₁D₂D₃D₄” hibrid interferont kódoló gént úgy állíthatjuk elő, hogy a pAM21 plazmid kis HindIII-Sau3A fragmentumát, a pAM21 plazmid kis Sau3A-PvuII fragmentumát és a pAM2 plazmid nagy PvuII-HindIII fragmentumát kapcsoljuk össze. Ez a szerkezet egy olyan plazmidot (pAM94) eredményez, amely a „B₁D₂D₃D₄” hibrid interferon kódoló szakaszt tartalmazza a β-laktamáz promoter szabályozása alatt. Ezzel analóg módon, úgy jutunk a „B₁D₂B₃B₄” hibrid interferont kódoló génhez, hogy összekapcsoljuk a pAM21 plazmid kis HindIII-Sau3A fragmentumát, a pAM2 plazmid kis Sau3A-PvuII fragmentumát és a pAM21 plazmid nagy PvuII-HindIII fragmentumát. Ez a szerkesztés eredményezi a pAM90 plazmidot, amely a „B₁D₂B₃B₄” hibrid interferont kódoló régióját tartalmazza a β-laktamáz promoter szabályozása alatt. Hasonló módon állíthatjuk elő a „B₁D₂B₃D₄” hibrid interferont kódoló szakaszt (pDM1 plazmid) vagy a „B₁D₂D₃B₄” hibrid interferont kódoló szakaszt (pDM2 plazmid) tartalmazó plazmidokat. Ezek a plazmidok alkalmasak arra, hogy E. coliban replikálódjanak és kifejezzék benne a hibrid IFN géneket. Ha a kívánt, bármelyik említett hibrid interferon kódoló DNS-inszertumot ki lehet hasítani a megfelelő plazmidból és be lehet juttatni egy másik vektor DNS-be. Ilyen módon olyan plazmidokhoz juthatunk, amelyek tartalmazzák a hibrid interferont kódoló szakaszát, de más promoter – nem a β-laktamáz promoter – szabályozása alatt és/vagy lehetővé teszik a gén kifejeződését az E. coli helyett más gazdasejtben.

A szóban forgó hibrid interferonok strukturális génjét magába foglaló DNS-t kémiai eljárással, szintetikus úton is előállíthatjuk. A DNS-szintézisére alkalmas módszereket S. A. Narang [Tetrahedron, 39, 3, (1983)] foglalta össze. Az ismert szintetizáló módszerek mintegy 20 bázis hosszúságú polinukleotidok előállítását teszik lehetővé jó kitermeléssel, nagy tisztasággal és viszonylag rövid idő alatt. A megfelelően védett nukleotidokat foszfodiészter módszerrel [K. L. Agarwal és munkatársai, Angew. Chem. 84, 489 (1972)] lehet egymással összekapcsolni vagy a még hatékonyabb foszfortriészter módszerrel [C. B. Reese, Tetrahedron, 34, 3143 (1972)] vagy a foszfittriszter módszerrel [R. L. Letsinger és munkatársai, J. Am. Chem. Soc., 98, 3655 (1976)]. Az oligonukleotidok és polinukleotidok szintézisének egyszerűsítését tette lehetővé a szilárd fázisos módszer, amelyben a nukleotid lánc egy megfelelő polimerhez van kötve. Itakura és

munkatársai [J. A. Chem. Soc., 103, 706 (1981)] foszfodiészter módszerrel, szilárd fázisos szintetizálást használva, trinukleotidokat kapcsoltak össze, ezek rövid időn belül és jó kitermeléssel kondenzálhatók. Ilyen módon például 31 bázisból álló polinukleotidot tudtak előállítani. A kívánt kétszálú DNS-t enzimatikus úton is fel lehet építeni, kémiai előállított rövid szegmentumokból. Erre a célra Kohrana és munkatársai [J. Biol. Chem., 251, 565 (1976)] mindkét DNS-fonálból álló átfedő polinukleotid szekvenciákat használnak, amelyek a bázispárok révén a helyes helyzetben kerülnek össze és amelyek ezután kémiai kötődnek egymáshoz DNS-ligáz enzimmel. Egy másik lehetőség szerint minden esetben a két DNS-fonálból származó, rövid átfedő szegmentummal rendelkező egy polinukleotid szekvenciát inkubálunk a négy szükséges dezoxinukleozid-trifoszfát jelenlétében DNS-polimerázzal, ilyen például a DNS-polimeráz I Klenow fragmentje, vagy a T4 DNS-polimeráz, vagy az AMV (avian Myeloblastosis vírus) reverz transzkriptázzal. A két polinukleotid szekvencia bázispárosodással a helyes elrendezésben kerül össze és a még szükséges nukleotidok az enzim segítségével pótlódnak, miáltal komplett kétszálú DNS keletkezik. [S. A. Narang és munkatársai, Anal. Biochem., 121, 356 (1982)]. Itakura és munkatársai [J. Biol. Chem., 257, 9226 (1982)] leírják, hogy ennek az elvnek az alapján a humán leukocita interferon α₂ gén 132 bázispár hosszúságú szegmentumát fel lehet építeni DNS-polimeráz I (Klenow fragment) jelenlétében 4 kémiai úton szintetizált 39–42 bázis hosszúságú fragmentumból. A kémiai szintézissel 40%-os megtakarítás érhető el, összehasonlítva azzal a módszerrel, amely csak ligáz használ. A jelen találmány szerinti DNS-ek előállítására megfelelő eljárást ír le például a 146785 számú európai szabadalmi bejelentés, amelynek tanulságai itt tájékoztatásként szerepelnek.

A találmány szerinti bármelyik hibrid interferon strukturális génjét tartalmazó kémiai szintetizált DNS-t be lehet építeni egy olyan vektor DNS-be, amely expressziószabályozó szekvenciát tartalmaz, mégpedig úgy, hogy az expressziószabályozó szekvencia irányítsa a szóban forgó gén kifejeződését.

2. A gazdasejtek transzformálása

A transzformált gazdasejt előállítási eljárása magában foglalja a gazdasejt transzformálását egy olyan DNS-szekvenciát tartalmazó kifejező vektorral, amely a találmány szerint előállított hibrid interferonok egyikét kódolja, és amelyet expressziószabályozó szekvencia irányít.

Alkalmas gazdák a fent példaként említett mikroorganizmusok, mint a Saccharomyces cerevisiae, Bacillus subtilis és Escherichia coli. A transzformálás a találmány szerinti kifejező vektorokkal történik, például ahogy a szakirodalom leírja a S. cerevisiae [A. Hinnen és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 75, 1929 (1978)], B. subtilis [Anagnostopoulos és munkatársai, J. Bacteriol., 81 741 (1961)] és E. coli [M. Mandel és munkatársai, J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)] eseteire.

Eszerint az *E. coli* sejtek transzformálási eljárása magába foglalja a sejt Ca^{2+} -mal való előkezelését, hogy végbemenjen a DNS felvétele és a hibrid vektorral való inkubálást. A sejteket ezután át kell vinni szelektív táptalajra, mely a transzformált sejteket az eredeti sejtektől elkülöníti. Azok a sejtek, amelyek nem tartalmaznak vektort, ilyen táptalajban elpusztulnak. Az élesztő transzformálása például a következő lépésekből áll: (1) az élesztő sejtfal enzimatiszta eltávolítása glükozidáz segítségével, (2) a kapott szferoplaszt kezelése a vektorral polietilén-glikol és Ca^{2+} -ionok jelenlétében, (3) a sejtfal regenerálása oly módon, hogy a szferoplasztot agarba ágyazzuk be. Előnyös, ha a regeneráló agar úgy készül, hogy egyszerre történjék meg a regenerálódás és a transzformált sejtek szelekciója.

3. A transzformált gazdasejtek tenyésztése és a kifejeződött hibrid interferon izolálása

A találmány tárgya eljárás az (I)–(VI) szekvenciájú hibrid interferonok előállítására. A módszert az jellemzi, hogy a szóban forgó hibrid interferonok bármelyikét kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó hibrid vektorral transzformált gazdasejteket tenyésztjük és a hibrid interferont izoláljuk.

A transzformált sejteket a szakmában ismert módszerekkel tenyésztjük olyan folyékony táptalajban, amely asszimilálható szén- és nitrogénforrást és anorgánikus sókat tartalmaz.

A találmány szerinti transzformált gazdasejtek tenyésztésére különböző szénforrások használhatók. Előnyös szénforrások például a szénhidrátok, ilyen a glükóz, mannit vagy laktóz, vagy acetát, amelyet magában vagy megfelelő keverékben lehet felhasználni. Megfelelő nitrogénforrás például az aminosavak – mint a kazein aminosavai – a peptidok és proteinek, ezek bomlástermékei, mint a tripton, pepton vagy a húskivonat; továbbá az élesztőkivonat, malátakivonat és az ammónium-sók is, például az ammónium-klorid, -szulfát vagy -nitrát, amelyeket önmagukban vagy megfelelő keverékekben lehet felhasználni. Felhasználható anorgánikus sók még például a nátrium, kálium, magnézium és kalcium szulfátjai, kloridjai, foszfátjai és karbonátjai.

A táptalaj tartalmaz még például növekedést serkentő anyagokat, ilyenek a nyomelemek, például vas, cink, mangán és hasonlók és olyan előnyös anyagokat, amelyek elősegítik a szelekciót és megakadályozzák azoknak a sejteknek a növekedését, amelyekben nincs expressziós plazmid. Így például ampicillint adunk a táptalajhoz, ha az expressziós plazmid amp^R gént tartalmaz. Az ilyen antibiotikus anyagoknak még olyan hatásuk is van, hogy elpusztítják a szennyező, antibiotikum-érzékeny mikroorganizmusokat is. Ha gazdamikroorganizmusként olyan élesztőtörzset használunk, amely például egy esszenciális aminosavra nézve auxotróf, akkor előnyös, ha a plazmid egy olyan enzimet kódoló gént tartalmaz, ami a gazdasejt hibáját kigazítja. Az élesztőtörzset olyan minimál táptalajon tenyésztjük, amely az illető aminosavat nem tartalmazza.

A tenyésztés a szakterületen ismert módszerekkel történik. A tenyésztési körülményeket, mint a hőmérsékletet, a táptalaj pH-ját és a fermentálás idejét úgy választjuk meg, hogy magas titerű hibrid interferont kapjunk. Tehát előnyös, ha egy *E. coli* vagy élesztőtörzset aerob viszonyok mellett, merülő tenyészetben rázással, vagy keveréssel, 20–40 °C hőmérsékleten – előnyösen körülbelül 30 °C-on – pH 4–8 között – előnyösen körülbelül pH=7 mellett – 4–30 órán át, de előnyösen addig tenyésztünk, amíg el nem érjük a hibrid interferon maximális kitermelését.

Meglepő módon azt találtuk, hogy például a standard feltételek mellett tenyésztett transzformált élesztő nyers extraktumában a találmány szerinti hibrid interferonok – például a „B₁D₂D₃B₄”, „B₁D₂B₃D₄”, „B₁D₂D₃D₄”, „B₁D₂B₃B₄” hibrid interferon – elérhető maximális titerei határozottan magasabbak, mint az interferon- $\alpha 2$ és „B₁B₂D₃D₄” és „D₁D₂B₃B₄” hibrid interferonok titerei, amelyek szoros rokonságban vannak a 4414150 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban szereplő „BD” és „DB” hibrid interferonokkal.

Ha a sejtűrűség megfelelő értéket ér el, a tenyésztést megszakítjuk és a hibrid interferont felszabadítjuk a gazdasejtből. Ezért a sejteket elroncsoljuk, például detergens kezeléssel – ilyen detergens az SDS (nátrium-dodecil-szulfát) vagy Triton – vagy lizozim-mel vagy egy hasonlóan ható enzimmel lizáljuk. Ha élesztőt használunk a gazda-mikroorganizmusként, a sejtfalat valamely glükozidáz enzimmel való emésztéssel távolíthatjuk el. A sejtek elroncsolását más módon is, vagy kiegészítésül, mechanikai erővel is végezhetjük, ilyenek a nyíróerők (például X-press, French-press, Dyno malom); vagy a sejteket üveggyönggyel vagy alumínium-oxiddal rázzuk együtt; vagy váltogatjuk a fagyasztást (például folyékony nitrogénben) a felolvasztással, például 30–40 °C-ig; vagy ezenkívül még ultrahangot is használhatunk. A centrifugálás után – magától értetődő módon – a kapott keverékben, mely proteineket, nukleinsavakat és más sejtalkotórészeket tartalmaz, feldúsítjuk a proteineket a bennük lévő interferonnal együtt. Így például a nem protein jellegű alkotórészeket polietilén-imin kezeléssel eltávolítjuk és a proteineket, beleértve a hibrid interferonokat is, kicsapjuk, például úgy, hogy az oldatot ammónium-szulfáttal vagy más sókkal telítjük. A bakteriális proteineket például 0,1%-os ecetsavval (pH=4-5) való savanyítással is ki lehet csapni. A további tisztítási lépések közt vannak például a következők: ultraszűrés, diafiltrálás, gél-elektroforézis, kromatográfiás eljárások, mint például az ioncsereelő kromatográfia, a méret szerinti kizárásos kromatográfia, a HPLC, a reverz fázisos HPLC és ehhez hasonló, az elegy alkotórészeinek elválasztása molekulaméret, nagyság szerint, megfelelő Sephadex-oszlop segítségével, dialízis, affinitáskromatográfia, például antitest – különböző monoklonális antitest – affinitáskromatográfia és más olyan ismert eljárások, amelyek a szakterületen ismertek.

Meglepő, hogy a találmány szerinti eljárással előál-

lított hibrid interferonok termostabilitása magasabb, mint a LyIFN- α -2 interferoné és a „B₁B₂D₃D₄” hibrid interferoné. Azaz a hőmérséklet, amelyenél a vírusellenes aktivitás 50%-a elvész (az IFN oldat hőmérséklet-növekedése 1 °C/perc), 62,8 °C a LyIFN- α -2 esetében és 63 °C a „B₁B₂D₃D₄” hibrid interferon esetében, míg a „B₁D₂D₃D₄”, „B₁D₂B₃B₄”, „B₁D₂B₃D₄” és „B₁D₂D₃B₄” hibrid interferonoknál a megfelelő érték 65 °C, 64,7 °C, 65,3 °C, illetve 64,2 °C.

A hibrid interferonok biológiai tulajdonságai és gyógyszerkészítmények

A jelen találmány szerinti eljárással előállítható hibrid interferonok olyan előnyös biológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, hogy emiatt értékes gyógyszernek minősülnek.

A találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferonok igen hatásos vírusellenes aktivitásukkal tűnnek ki emlős sejtek esetén, ilyenek a bovin és főleg a humán sejtek. A vírusellenes titerek, amelyeket a citopátiás hatás redukciójával, S. Rubinstein és munkatársai módszere szerint [J. Virol., 37, 755 (1981); bovin (MDBK) és humán (WISH) sejtek ráfertőzése vezikuláris stomatitis vírussal (VSV) történik] határoztuk meg a következőképpen:

I. táblázat

Hibrid interferonok vírusellenes titerei
VSV-t használva ráfertőző vírus gyanánt

Interferon	Specifikus aktivitás/mg protein	
	bovin	humán
„B ₁ D ₂ D ₃ D ₄ ”	1,25·10 ⁸	1,3·10 ⁸
„B ₁ D ₂ B ₃ B ₄ ”	1,25·10 ⁸	1,3·10 ⁸
„B ₁ B ₂ D ₃ B ₄ ”	9,5 × 10 ⁷	>2·10 ⁸
„B ₁ D ₂ B ₃ D ₄ ”	1,9 × 10 ⁸	7,7·10 ⁷
„B ₁ D ₂ D ₃ B ₄ ”	7,2·10 ⁷	3,8·10 ⁷
„B ₁ B ₂ B ₃ D ₄ ”	1,05·10 ⁸	8·10 ⁷
„D ₁ D ₂ B ₃ B ₄ ” (DB)	8,5·10 ⁷	3,3·10 ⁵
„B ₁ B ₂ D ₃ D ₄ ” (BD)	1,15·10 ⁸	2,33·10 ⁸
α -2 („B”)	1,05·10 ⁸	2,13·10 ⁸
α -3 („D”)	5,5·10 ⁷	6,7·10 ⁶

A találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferonok vírusellenes aktivitása nemcsak humán sejtekre korlátozódik, hanem mindig interspecifikusak. A „B₁D₂D₃D₄”, „B₁D₂B₃B₄”, „B₁B₂D₃B₄”, „B₁D₂B₃D₄” és „B₁B₂B₃D₄” hibrid interferonoknak a humán sejtekre gyakorolt vírusellenes hatása hasonló fokú, mint az eredeti α -2 interferoné és a „B₁B₂D₃D₄” interferoné, amely szoros rokonságban van a 4414150 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban szereplő „BD” hibrid interferonnal, de jelentősen nagyobb a hatásuk (10–30-szoros), mint a „D₁D₂B₃B₄” referens hibrid interferonnak (230–600-szoros).

A humán sejtekre kifejtett általános vírusellenes hatástól eltekintve, a találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferonok a célsejtek sokkal specifikusabb választást idézik elő. Így tehát számos intracelluláris enzim indukálódik, az interferon hatására. Ezek közt az enzimek közt van a (2'–5') oligo-izoadenilát szintetáz („2–5 A szintetáz”), amely a (2'–5') kötésű oligonukleotidokat hozza létre és ezek ezután egy olyan latens endoribonukleázt aktiválnak, mely a vírus mRNS-t hasítja. Meglepő módon azt találtuk, hogy a találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferonok, így a „B₁D₂D₃D₄”, „B₁D₂B₃B₄”, „B₁B₂D₃D₄” és „B₁B₂B₃B₄” interferon, különösen hatékony induktorai humán sejtekben a 2–5 A szintetáz aktivitásnak. Azaz a „B₁D₂D₃D₄”, „B₁D₂B₃B₄”, „B₁B₂D₃D₄” és „B₁B₂B₃D₄” hibrid interferonokból 10³ egység/ml 17,5, 11,4, 8,5, illetve 9,6-szorosára növeli a 2–5 A szintetáz aktivitását Daudi sejtekben, összehasonlítva az eredeti α -2 és α -3 interferonnal és a referens „B₁B₂D₃D₄” és „D₁D₂B₃B₄” interferonnal, amelyek 5,6, 3,9, 4,0, illetve 4,3-szoros aktivitás-növekedést eredményeznek.

A találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferonok ezenfelül antiproliferatív aktivitást fejtenek ki. Az antiproliferatív aktivitást a következőképpen lehet meghatározni: az interferon tartalmú oldatokat ml-enként 5·10⁴ Daudi sejttel inkubáljuk, 2 ml 10% fetális borjuszérumot tartalmazó RPMI táptalajban. A sejtszaporodást 3 napos inkubáció után határozzuk meg úgy, hogy az élő sejteket haemocytométerben megszámloljuk Trypan kék kizárásos teszt segítségével. A Daudi sejtek szaporodásának 50%-os gátlásához a „B₁D₂D₃D₄”, „B₁D₂B₃B₄”, „B₁B₂D₃D₄”, „B₁B₂B₃B₄”, „B₁D₂B₃D₄” és „B₁D₂D₃B₄” hibrid interferonokból körülbelül 4, 4, 1,3, 1,3 4, illetve 4 egység/ml szükséges, azaz megközelítően azonos mennyiség, mint az eredeti α -2 interferonból és a „B₁B₂D₃D₄” referens interferonból (1,3 egység/ml), de felülmúlják az eredeti α -3 interferont (körülbelül 20 egység/ml) és a „D₁D₂B₃B₄” referens hibrid interferont is (körülbelül 400 egység/ml).

A humán ráksejtekkel szembeni antiproliferatív aktivitást szintén ki lehet mutatni in vivo. E célra különböző humán eredetű rákbetegséget – ilyen a mell-, vastagbél- és tüdőrák, méhrák és melanoma – fejlesztünk ki csupasz egérben. A kifejlődött tumorokból kis darabkákat izolálunk és ezeket trokárral átültetjük egerekbe (Balb/c × D-BA/2)F₁ (CDF₁) a vese-tok alá. Az IFN-t intramuszkulárisan adjuk be. 5·10⁵–5·10⁷ NE/kg-ot tartalmazó injekciókban naponta kétszer, 1–5 napon át. (NE = nemzetközi egység). A 6. napon az állatokat elöljük, a tumor végső nagyságát megmérjük és összehasonlítjuk a tumor kezdeti (az IFN-kezelés előtti) nagyságával és a kezeletlen kontrollegerek tumorának nagyságával. A találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferonokkal, például a „B₁D₂D₃D₄” és „B₁B₂D₃B₄” interferonnal való kezelés jelentősen és szignifikánsan gátolta a tumorok növekedését és részben a tumorok regresszióját is megfigyelhettük. Meglepő, hogy a hibrid interferonok antiproliferatív aktivitása felülmúlja az α -2 és α -3 kiindukási inter-

feronok, valamint a „B₁B₂D₃D₄” és „D₁D₂B₃B₄” hibrid interferon aktivitását.

A találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferonok, vírusellenes és antiproliferatív tulajdonságaik folytán, az emberi és állati szervezet vírusfertőzéseinek – ilyen az influenza és más légúti vírusfertőzések, herpes vírusfertőzések, a veszettség és hepatitis fertőzés – valamint neoplazmás megbetegedéseinek, mint melanoma, veserák és a hairy cell leukémia, a kezelésére alkalmasak, adott esetben más vírusellenes vagy tumorelles szerekkel kombinálva, előnyösen olyan gyógyszerkészítmények formájában, amelyek az aktív alkotórészből terápiásan hatékony mennyiségeket tartalmaznak, előnyösen a gyógyszergyártásban elfogadott szervetlen vagy szerves, szilárd vagy folyékony, parenterális alkalmazásra legalkalmasabb vívőanyagokkal együttesen, vagy kiegészítésként.

A parenterális készítmények olyan injekciós folyadékok, amelyek különféle módon alkalmazva hatnak, így intravénás, intramuszkuláris, intraperitoneális, intranazális, intradermális vagy szubkután alkalmazásban. Ezek a folyadékok előnyösen izotonias vizes oldatok vagy szuszpenziók, amelyeket felhasználás előtt lehet elkészíteni, például olyan liofilizált készítményekből, amelyek az aktív hatóanyagot magában vagy a gyógyszergyártásban bevezetett hordozókkal együtt tartalmazzák. A gyógyszerkészítmények sterilizálhatók és/vagy adalékanyagokat tartalmazhatnak, ilyenek például a konzerváló szerek, stabilizáló és nedvesítő szerek és/vagy emulgeáló szerek, oldódást elősegítő szerek, valamint az ozmózis nyomást szabályozó sók és/vagy pufferek. Ezek gyógyszerkészítmények, amelyek – ha kívánt – egyéb gyógyszerként alkalmazható anyagokat is tartalmaznak, magától értetődő, ismert módon készíthetők, például megszokott liofilizálási eljárásokkal, amikor az aktív hatóanyagból 0,1%–100%-ot, főként körülbelül 1–50%-ot tartalmaz az oldat, maga a liofilizátum pedig 100%-ig terjedő töménységben tartalmazza a hatóanyagot. Érdeemes megjegyezni, hogy a találmány szerinti hibrid interferonokat, mint a „B₁D₂D₃D₄”-et is, aktivitásvesztés nélkül lehet liofilizálni, majd feloldani. Ezzel szemben az eredeti liofilizált α-2 és α-3 interferon készítménynek zavaros oldatot adnak, jelentős aktivitásvesztéssel. Ez utóbbi interferonokat ezért csak puffertolt oldatokban lehet tárolni.

Az alkalmazás és adagolás egyedi módját a kezelő orvos választja meg, figyelembe véve a beteg egyéni tulajdonságait, a betegséget és a betegség súlyosságát. Például a vírusfertőzéseket rendszerint napi egyszeri vagy napi kétszeri adagokkal kezelik néhány napon, illetve néhány héten át, míg a neoplazmás betegségek kezelése napi vagy naponta sokszori adagolással történik hetekig vagy hónapokig. Ugyanazokat a dózisszinteket, azaz 10⁶–10⁷ egységet – lehet alkalmazni, mint a szokásos interferonterápiában.

Interferon hibridek elleni monoklonális antitestek

Új IFNα elleni monoklonális antitest, amelynek számos IFNα szubtypussal – beleértve az IFNα hibrideket is – szembeni affinitása nagy, de kis affinitású

más IFNα szubtypusokkal szemben és az ezeket szekretáló hibridoma sejteket állítunk elő.

Az új monoklonális antitestre jellemző, hogy az IFNα (B,d,F-fel és a rokon szubtypusokkal [lásd D. V. Geoddel és munkatársai, Nature, 290, 20 (1981)] és ezen szubtypusok hibridjeivel szemben, főként pedig e találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferonokkal szemben nagy az affinitása, de alacsony affinitású például az IFNα/A szubtypussal szemben.

A monoklonális antitest neve 144 BS. Ezt a monoklonális antitestet a 144 BS 22–6–19 jelzésű hibridoma sejtvonal szekretálja.

A találmány szerinti eljárásban használt monoklonális antitestre jellemző, hogy kötődni képes különböző humán IFNα szubtypushoz tartozó polipeptid-ekhez. Kötődési képessége meghatározható például az ún. kombinált immunprecipitációs bioassay segítségével, ahogy ezt S. S. Alkan és munkatársai leírták a „Protides of the Biologocal Fluids” című kiadványban [H. Peeters, Pergamon Press, 30. kötet, 495–498. oldal (1983)]. Ebben a vizsgálatban az IFNα-t tartalmazó folyadékot a vizsgálandó monoklonális antitesttel inkubáljuk, a kötött vagy kötetlen monoklonális antitesteket olyan poliklonális szérummal csapjuk ki, amely minden vizsgált antitestet megköt, az immunprecipitátumot elválasztjuk és visszaoldjuk savanyú oldatban, majd az ilyen módon felszabadult IFN-α-t az IFNα vírusellenes aktivitásán alapuló egy klasszikus bioassay-vel határozzuk meg.

Meglepő, hogy a találmány szerinti eljárással előállított monoklonális antitest erősen kötődik az IFNα B, D, F szubtypusához és ezek hibridjeihez, továbbá az IFNα C és J szubtypusaihoz is, de igen kis affinitást mutat az IFNα A szubtypusához. Ez utóbbi szubtypust minden más ismert olyan monoklonális antitest megköt, amelyek háromnál több IFNα szubtypust ismernek fel, azaz a széles szubtypus felismeréssel bíró antitestek, mint például az NK2 monoklonális antitest (D. Secher és munkatársai, Nature, 285, 446 (1980)), az EBI–1, 2 és 3 monoklonális antitest (EP 119,476 számú európai szabadalmi bejelentés) vagy a LO–22 monoklonális antitest (WO 84/03106 számú szabadalmi bejelentés).

Összehasonlítva a YOK monoklonális antissal (WO 84/03105 szabadalmi bejelentés), amely az IFNα D szubtypusára specifikus, a találmány szerinti eljárásban használt monoklonális antissal meglepően széles a specificitása, különösen a B és F IFNα szubtypusokra nézve, amelyeket a YOK antiss nem köt meg.

A 144 BS elnevezésű, a találmány szerint alkalmazott monoklonális antiss az IgG₁κ (kappa) immunoglobulin osztályához tartozik, meghatározása a jól ismert Ouchterlony-féle immundiffúziós módszerrel történt, osztály-specifikus második antiss használatával.

A találmány szerint alkalmazott monoklonális antiss és származékai előállítását közismert eljárásokkal végezzük, amelyekre jellemző, hogy a 144 BS 22–6–19 elnevezésű sejtvonalat

a) in vitro tenyésztjük és a tenyészet felülúszójából izoláljuk a monoklonális antitestet, vagy

b) in vivo szaporítjuk alkalmas emlősszervezetben és monoklonális antitestet az illető emlős testfolyadékaiból izoláljuk és, ha kívánt,

c) a monoklonális antitestet egy származékává konvertáljuk.

Az a) eljárás szerinti in vitro tenyésztéshez megfelelő táptalajok a standard táptalajok, ilyen a Dulbecco-féle módosított Eagle tápoldat vagy az RPMI 1640 tápoldat, amelyeket alkalmanként emlősszérummal, például fetális borjúszérummal egészítünk ki. A monoklonális antitest izolálása úgy történik, hogy a tenyészet felülúszójában levő proteint ammónium-szulfáttal vagy ehhez hasonló anyaggal kicsapjuk, majd az immunglobulint standard kromatográfiás módszerekkel – ilyen a géliszűrés, ioncserélő kromatográfia, kromatografálás DEAE cellulózon vagy immun-affinitáskromatográfia – tisztítjuk.

A kívánt monoklonális antitestből nagy mennyiségeket kaphatunk, ha a hibridoma sejtvonalat a b) eljárás szerint szaporítjuk el. A sejtklonokat szingenetikus emlősökbe oltjuk, ahol antitesttermelő tumorok keletkeznek. Egy-három hét elteltével a kívánt monoklonális antitestet az illető emlős testfolyadékaiból izoláljuk. Például a Balb/c egérből származó hibridoma sejtvonalat olyan Balb/c egerekbe oltjuk interperitoneálisan, amelyeket ez esetben egy szénhidrogénnel, például Pristane-nal (2,6, 10, 14-tetrametil-pentadékan), előkezeltünk és egy vagy két hét elteltével az egerek aszcitesz folyadékát összegyűjtjük. A testfolyadékokból ismert módszerekkel izoláljuk a monoklonális antitestet, például úgy, hogy a proteint ammónium-szulfáttal vagy ehhez hasonló anyaggal kicsapjuk, ezt követi az immunglobulin tisztítása standard kromatográfiás módszerekkel, mint géliszűréssel, ioncserélő kromatográfiával, DEAE cellulózon való kromatografálással vagy immunaffinitáskromatográfiával.

A monoklonális antitestek fragmentumait, például a Fab, Fab' vagy F(ab')₂ fragmentumokat, amelyek az IFN α szubtypusok antigén determinánsaival szembeni specificitásukat megtartják, olyan monoklonális antitestekből kaphatjuk meg, amelyeket az a) vagy b) eljárással, ismert módszerekkel, például enzimés emésztéssel – például pepszinnel vagy papainnal – és/vagy a diszulfid kötések kémiai redukciójával állítunk elő.

Radioaktív jódval jelzett monoklonális antitesteket a szakterület ismert jódosítási módszereivel állítunk elő, például úgy, hogy a monoklonális antitestet radioaktív nátrium- vagy kálium-jodiddal jelezzük, kémiai oxidálószerrel, ilyen a nátrium-hipoklorit, kloramin-T vagy hasonló, vagy oxidáló enzimmal, ilyen a laktoperoxidáz, glükóz-oxidáz és glükóz. A találmány szerint alkalmazott radioaktív, jelzett monoklonális antitesteket úgy is előállíthatjuk, hogy az a) lépés szerinti in vitro tenyésztés esetén a táptalajhoz radioaktív jelzéssel ellátott tápanyagokat adunk. Az ilyen jelzett tápanyagok például radioaktív szén (¹⁴C), tritiumot (³H), ként (³⁵S) stb. tartalmaznak, példa ezekre az L-(¹⁴C)-leucin, L-(³H)-leucin vagy az L-(³⁵S)-metionin.

A találmány szerint felhasznált monoklonális antitest konjugátumok előállítása a szakterület ismert módszerei szerint történik, például az a) vagy b) lépés szerint termelt monoklonális antitestet vagy ennek egy fragmentumát – amelyet az előbbieken leírtak szerint készítettünk – enzimmal reagáltatjuk, konjugálószer jelenlétében, ilyen például a glutaraldehid, perjodát, N-N'-o-feniléndimalein-imid, N'(m-malein-imidobenzil-oxi)-szukcin-imid, N-etil-N'-(3'-dimetil-aminopropil)-karbodiimid és így tovább. A biotinos konjugátumok például úgy készülnek, hogy a monoklonális antitestet egy aktivált biotio-észterrel – ilyen a biotin-N-hidroxi-szukcinimid-észter – reagáltatjuk.

A 144 BS 22-6-19 nevű hibridoma sejtvonalat 1985 március 14-én letétbe helyeztük a párizsi Pasteur Intézetben a „Collection Nationale de Cultures des Microorganismes” gyűjteményében, I-424 letéti szám alatt. Az a hibridoma sejtvonala az Sp2/O-Ag14 egér myeloma sejtvonala és természetes humán IFN α -val immunizált Balb/c egér-lép egy B limfocitájának a hibridja. Ez egy stabil sejtvonala, amely a 144 BS jelű monoklonális antitestet szekretálja. A sejtvonala fenntartható tenyészetben és folyékony nitrogénben mélyfagyasztva, ahonnan felolvasztással reaktiválható.

A 144 BS monoklonális antitestet szekretáló hibridoma sejtvonala előállítási eljárása a következő lépésekből áll: Balb/c egereket immunizálunk természetes humán IFN α -val, az egér antitest-termelő lép sejtjeit az Sp2/O-Ag14 myeloma sejtekkel fuzionáljuk, majd kiválasztjuk a kívánt antitestet szekretáló sejtklont.

Az egér immunizálását úgy végezzük, hogy például a természetes humán IFN α t négyszer parenterálisan – intraperitoneálisan és/vagy szubkután – injiciáljuk 10–40 nap időközönként körülbelül 10⁵–10⁶ NE dózisban. Az injekciók alkalmanként adjuváns – ilyen a komplett vagy inkomplett Freund adjuváns – tartalmaznak, amely stimulálja a limfocitatermelődést.

Az utolsó emlékeztető oltás után kettő-öt nap múlva kivett antitest lépsejteket az Sp2/O-Ag14 myeloma sejtvonala sejtjeivel fuzionáljuk fúziós promotor jelenlétében. Fúziós promotereknek tekintjük például a Sendai vírust vagy más paramyxovírusokat, esetenként UV-besugárzással inaktivált formában, a kalcium-ionokat, felületaktív lipideket, ilyen a lizolecitin vagy a polietilén-glikol. Előnyös, ha a myeloma sejteket az immunizált egerekből származó lépsejteket három-hússzoros feleslegében, 1000–4000 molekulásúlyú polietilén-glikolból 30–60%-ot tartalmazó oldatban fuzionáljuk.

Fúzió után a sejteket reszuszpendáljuk és szelektív HAT táptalajban tenyésztjük. Ekkor csak a hibridoma sejtek lesznek túlélők, mivel ezek egyesítik magukban az in vitro növekedés és replikáció képességét. Ezt a képességet egyrészt a myeloma sejtektől örökölték, amelyekből ugyan hiányzik a HAT táptalajban való túlélés szempontjából esszenciális HGPRT vagy TK gén, azonban ezeket a géneket az immunizált egerek antitesttermelő lépsejtjeiből örökölték.

A hibridoma sejtek szaporítására alkalmas táptalajok a standard táptalajok. Ilyenek a Dulbecco-féle mó-

dosított Eagle-táptalaj, a Minimum Essential Medium (MEM), az RPMI 1640 táptalaj és így tovább, adott esetben szérummal, például 10–15% fetális borjúszérummal kiegészítve. A sejtnövekedés kezdetén előnyös, ha falósejteket adunk hozzájuk, például normál eger peritoneális exsudátum sejtekre, lépsejteket, csontvelő makrofágokat, vagy ezekhez hasonlókat. A táptalajot szabályos időközönként szelektív HAT-táptalajjal egészítjük ki, nehogy a normál myeloma sejtek túlnövekedjenek a hibridoma sejteken.

A hibridoma sejtenyészet felülűszoját a kívánt monoklonális antitestre nézve vizsgáljuk, előnyösen egy kombinált immunprecipitációs bioassay-val vagy radio-immunassay-val. A pozitív hibridoma sejteket klónozzuk, például határhígításos módszerrel, előnyösen kétszer vagy többször. A klónozott sejtvonalatokat a szokásos módon lefagyaszthatjuk.

A találmány szerint alkalmazott antitestet és/vagy származékait felhasználhatjuk a természetes eredetű vagy rekombináns DNS-módszerekkel előállított humán IFN α szubtypusok és humán hibrid IFN-ek, különösen a találmány szerinti eljárással előállított hibrid IFN-ok minőségi és mennyiségi meghatározásánál és tisztításánál.

Például a monoklonális antitestet vagy származékait – ez lehet enzimkonjugátum vagy radioaktív származék – bármelyik olyan ismert immunassay-ban fel lehet használni, amely az antigén determináns – például egy IFN α aktivitású polipeptid antigén determinánsa – és a monoklonális antitest közti keresztököttes reakción alapszik. Példaként említjük a következő vizsgálati módszereket: radioimmunassay, enzim immunassay, immunfluoreszcencia, latex agglutináció és hemagglutináció. Ezek az immunassay-k például a természetes eredetű vagy génmanipulált mikroorganizmusból származó IFN α és hibrid IFN α promoterek termelésének és tisztításának az irányításánál használhatók, továbbá az IFN α és hibrid IFN α minőségi és mennyiségi meghatározására használhatók biológiai folyadékokban, például olyan betegek testfolyadékában, akik IFN α kezelést kapnak, vagy szükségük van ilyen terápiára.

A találmány szerinti eljárásban felhasznált monoklonális antitest eredeti és radioaktív izotóppal jelzett származék formájában radioimmunassay-ban (RIA) alkalmazható. Az IFN α direkt vagy indirekt (kompetitív) meghatározásánál a RIA-nak bármelyik ismert módosított változata használható. Például a homogén fázisú RIA, szilárd fázisú RIA vagy heterogén fázisú RIA és a szinguláris vagy kettős (szendvics) RIA. Itt a szendvics RIA az előnyös, amelyben a megfelelő hordozó például egy mikrotitráló lemez vagy egy műanyag kémcső felülete, mely lehet például polisztirol, polipropilén vagy polivinil-klorid. Hordozók lehetnek továbbá üveg- vagy műanyag gyöngyök, szűrőpapír vagy dextrans, cellulóz-acetát vagy nitrocellulóz lemez és ehhez hasonlóak, mindezek egy IFN α szubtypusra specifikus monoklonális antitesttel vannak fedve egyszerű adszorpció révén vagy pedig esetenként a hordozó aktiválása révén, melyet glutár-aldehiddel vagy

brómcíánnal végzünk. Az így készített hordozót a vizsgálandó oldattal és egy ^{125}I -dal jelzett radioaktív monoklonális antitestet tartalmazó oldattal együtt inkubáljuk. Az oldatban lévő monoklonális antitest az

5 IFN α szubtypus más etiópóját ismeri fel, mint a hordozóhoz kötött monoklonális antitest, így az IFN α vagy hibrid IFN α mennyiségét a hordozóhoz kötődött radioaktivitás mértékével határozzuk meg. Egy ilyen előnyös radio-immunassay-ban vagy a hordozóhoz kötött antitestet vagy a jelzett antitestet a jelen találmány szerinti eljárásban felhasznált monoklonális antitest vagy ennek származéka, mint ahogy ezt az előzőekben leírtuk, a másik antitest egy olyan IFN α elleni monoklonális antitest, amely a jelen találmány oltalmi körén kívül esik, vagy egy poliklonális antitest, adott esetben radioaktív izotóppal jelzett származéka formájában.

Különösen előnyös az előbbieken leírt szendvics radio-immunassay, amelyben a találmány szerinti eljárásban alkalmazott monoklonális antitest gyöngyhöz van kötve, például polisztirol gyöngyhöz és a fedett gyöngyöt IFN α -t vagy hibrid IFN α -t tartalmazó standard tesztoldatban inkubáljuk, amelyet végül olyan radiológiai jelzett monoklonális antissal

25 hívunk elő, amely egy másik IFN α epitópot ismer fel. A 4. és 5. ábra a hordozóhoz kötött radioaktivitást ábrázolja a tesztoldatban lévő IFN α /B szubtypushoz tartozó IFN α -2 polipeptid mennyiségének függvényében. A meghatározás szendvics RIA-val történik, amelyet a kísérleti részben részletesen ismertetünk. A RIA érzékenysége 150–5000 NE/ml IFN α -2 szubtypust tartalmazó oldat gyors és megbízható mennyiségi meghatározást teszi lehetővé, vagy ha egy sokkal időigényesebb módszert választunk, akkor egy NE/ml

30 35 40 45 50 55 60
mennyiségű IFN α -2 szubtypust is meghatározhatunk. Hasonló eredményekhez jutunk más IFN α szubtypushoz tartozó polipeptidek szendvics RIA-val való meghatározása esetén, például az IFN α /D szubtypus vagy az IFN α /F szubtypus és főként a találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferonok meghatározása esetén.

A találmány szerint a monoklonális antitestet fel lehet használni eredeti formájában vagy enzimmal konjugált származéka formájában enzim-immunassay-ban. Az ilyen immunassay-k olyan vizsgálati eljárást foglalnak magukba, melyben a következők kerülnek felhasználásra: enzimmal jelzett találmány szerinti monoklonális antitest származék; enzimmal jelzett ismert antitest, amely felismeri és megköti a 144BS anti-IFN α antitest epitópjait; más anti-IFN α antitestek. Előnyös az ELISA (enzyme-linked immunadsorbent assay) módszer, amelyben egy a RIA-nál fent leírt hordozót monoklonális antissal fedünk, ezt az IFN α -t tartalmazó teszt-oldattal, majd egy IFN α elleni poliklonális szérummal például juhszérummal inkubáljuk és végül a poliklonális szérumból megkötött antitesteket olyan enzimmal jelzett antissal hívjuk elő, amelyek ezeket felismerik és megkötik, s a megkötött IFN α mennyiségét enzim-szubsztrátum reakcióval határozzuk meg. Ilyen enzimmal jelzett anti-

test például a foszfátazzal jelzett kecske anti-birka immunoglobulin.

Ugyancsak előnyös egy olyan ELISA, amelyben egy IFN α szubtípusra specifikus monoklonális antitesttel fedett hordozót az IFN α -t tartalmazó tesztoldattal és egy enzimmel konjugált monoklonális antitestet tartalmazó oldattal inkubálunk, s az oldott monoklonális antitest az IFN α szubtípusnak más epitópját ismeri fel, mint amit a hordozóhoz kötött monoklonális antitest. A megkötött enzim mennyiségét, amely arányos a tesztoldatban lévő IFN α vagy hibrid IFN α szubtípus mennyiségével, enzim-szubsztrátum reakció segítségével – a reakció például színváltozást eredményez, amelyet szemmel vagy optikai mérőmodszerekkel észlelhetünk – mérjük meg.

Különösen előnybe helyezzük az immunodot analízisnek nevezett enzim immunassayt, amelyben az IFN α -t vagy hibrid IFN α -t tartalmazó vizsgálandó vagy standard oldatot olyan mikroporózus hordozóra, például nitrocellulózra csepegtjük, amelynek nagy a belső affinitása polipeptidekhez. A hordozót, melyen az említett IFN α -t tartalmazó mintákból egy vagy több folt van, a találmány szerinti monoklonális antitest oldatában inkubáljuk, majd egy enzimmel jelzett második antitest oldatában, mely utóbbi antitest felismeri és köti a találmány szerinti monoklonális antitestet, végül egy olyan szubsztrátum oldatban inkubáljuk, amely észlelhető jelet, például színes vegyületet eredményez. Ilyen enzimmel jelzett második antitest például a torna peroxidázzal konjugált nyúl anti-egér immunoglobulin, s ezt megfelelő szubsztrátummal, például 4-kloro-1-naftollal vagy hasonló vegyülettel hívhatjuk elő.

A BS 144 monoklonális antitestnek és származékainak a felhasználása – amint ezt az előbbieken leírtuk – az IFN α szubtípusok vagy a hibrid IFN α minőségi és mennyiségi meghatározásához szolgáló más közismert immunassay-eket is magában foglal, például immunfluoreszcenciás vizsgálatokat, ahol fluoreszkáló anyagokkal előállított antitest-konjugátumok vagy antigén-konjugátumok kerülnek alkalmazásra, továbbá a latex agglutinációt, ahol antitesttel vagy antigénnel fedett latex-partikulák szerepelnek vagy a hemagglutinációt, amelyben antitesttel vagy antigénnel fedett vörösvérsejteket használunk és így tovább.

A tesztkészletek, amelyek a találmány szerinti eljárással előállított IFN α szubtípusok és a hibrid IFN α minőségi és mennyiségi meghatározását szolgálják, a 144 BS monoklonális antitestet és/vagy ennek a származékát tartalmazzák és adott esetben humán IFN α elleni más monoklonális vagy poliklonális antitesteket és/vagy kiegészítő anyagokat.

Például egy radio-immunassay-hez összeállított tesztkészlet tartalma a következő: megfelelő hordozó, amely lehet fedetlen vagy IFN α -val szembeni monoklonális antitesttel fedett, adott esetben IFN α elleni monoklonális vagy poliklonális antitest liofilizálva, vagy koncentrált oldatban és/vagy ezek radioizotóppal jelzett származékai. A készletben a monoklonális antitestek közül legalább az egyik – vagy a hordozóhoz

kötött, vagy az oldatban lévő, vagy a jelzett – a találmány szerinti monoklonális antitest. A készlet tartalmazhat továbbá standard humán IFN α oldatokat, puffer oldatokat és esetenként polipeptideket és detergenseket az aspecifikus adszorpció és aggregátumképződés megakadályozására, ezenkívül pipettákat, edényzetet a reakciókhoz, kalibrációs görbékét és így tovább.

Egy enzim immunassay-hez szolgáló tesztkészlet tartalma például a következő: megfelelő hordozó, IFN α elleni monoklonális és/vagy poliklonális antitest liofilizálva vagy koncentrált oldat formájában, IFN α -val vagy az IFN α -t felismerő első antitesttel szembeni enzimmel jelzett monoklonális vagy poliklonális antitest, ahol az IFN α elleni antitestszármazék közül legalább az egyik a találmány szerint felhasznált monoklonális antitest vagy ennek származékai. Tartalmaz a készlet továbbá szubsztrátumot oldatlan vagy oldott formában, standard humán IFN α oldatokat, pufferoldatokat és adott esetben polipeptideket és detergenseket, pipettákat, reakcióedényeket, kalibrációs görbékét, színskálátáblázatokat és így tovább.

A természetes eredetű IFN α -t vagy IFN α szubtípusokat, vagy az IFN α -val rokon polipeptideket, amelynek a találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferonok is, immunaffinitáskromatográfiával tisztíthatjuk, a találmány szerinti monoklonális antitest segítségével. A monoklonális antitestet vagy ennek származékát alkalmas szerves vagy szervetlen hordozóhoz kötjük, esetenként ezek aktiválása után, ilyen a térhálós agaróz, a dextrans vagy a poliakrilamid. E műveletet a szakterületen ismert általános módszerekkel végezzük. Például egy aktivált észter funkcióval rendelkező hordozót vizes puffer oldatban szuszpendálunk, elkeverjük a monoklonális antitestet vagy származékát oldatával, leszűrjük, reszuszpéndáljuk, majd mossuk a feleslegben lévő monoklonális antitest eltávolítására. A hordozót ezután egy irreleváns proteint tartalmazó oldattal kezeljük, hogy blokkoljuk a hordozó szabad, reaktív helyeit. Az így kapott, antitesttel fedett hordozót használjuk arra, hogy szelektíven megkösse a humán IFN α szubtípusokat, például az IFN α /B, IFN α /D és IFN α /F szubtípusokat és a rokon polipeptideket, amelynek például a találmány szerinti eljárással előállított hibrid interferonok glükózilált vagy nem glükózilált alakjai. Ezután a hordozóanyagot megfelelő vizes oldatban szuszpendáljuk, például sóoldatban – ilyen a nátrium-kloridoldat – vagy pufferoldatban – ilyen a foszfáttal pufferolt NaCl-oldat – vagy nátrium-hidrogén-karbonát vagy 3-(N-morfolino)propán-szulfonsav-oldatban, majd összekeverjük az IFN α -tartalmú oldattal, például úgy, hogy betöltjük egy kromatografáló oszlopba és az IFN α -t tartalmazó oldatot rávisszük az oszlopra és átszívjuk a hordozóanyagon, s ha kívánt, nyomás alatt. A kötetlen proteinek és az egyéb szennyezőanyagokat kimossuk az oszlopból vizes oldatokkal, például körülbelül 5–9 pH tartományon belüli pufferoldatokkal és/vagy sóoldatokkal, például NaCl-oldattal. A hordozón lévő anti-

test által megkötött IFN α -t megfelelő vizes oldatokkal eluáljuk, például körülbelül 2–5 pH-érték közti puffer-oldatokkal – ilyen a glicerín-puffer, vagy citromsavval vagy különböző összetételű pH gradienssel vagy sóoldatokkal, például tömény ammónium-szulfocianid-oldattal. Az IFN α -t tartalmazó eluátumot esetenként neutralizáljuk és innen izoláljuk ismert eljárások szerint a tisztított IFN α -t.

A következő példák a jelen találmány magyarázatául szolgálnak, anélkül, hogy a találmány oltalmi körét e példákra korlátoznánk.

A kísérleti részben említett mikroorganizmusok és vektorok ezért csupán példaként szolgálnak az eljárás megvalósításának szemléltetéséhez, és tetszőleges más, a heterológ expresszió szempontjából alkalmasnak tekinthető mikroorganizmusokkal, illetve vektorokkal helyettesíthetők. Ez utóbbiak a szakember számára jól ismertek, a letétbe helyezési intézetektől beszerezhetők, illetve a kereskedelemben hozzáférhetők.

E témakörben idézzük a „Cloning Vectors. A Laboratory Manual” c. kézikönyvet (P. H. Pouwels et al., Elsevier, Amsterdam, 1985) is.

A szakember számára a leírásban idézett eljárások módok és azok részletei ismeretesek, pl. az enzimés átalakításokat (pl. a restrikciós enzimekkel végzett hasítást) a szakember lényegében azon reakciókörülmények között végzi, amelyeket az adott enzim gyártója vagy a forgalmazó katalógusaiban ajánl, vagy amelyek a szakirodalomból, pl. Maniatis kézikönyvéből (T. Maniatis et al.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, 1982) megismerhetők.

KÍSÉRLETI RÉSZ

A példákban használt egyes rövidítések, illetve kifejezések:

DTT	1,4 ditiotreitolt
TNE	50 mmól trisz. HCl (pH=7,5), 100 mmól NaCl és 2 mmól EDTA tartalmú oldat
Tris	tris-(hidroximetil)-aminometán
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
TE	10 mmól Tris és 50 mmól EDTA tartalmú oldat

N-táptalaj összetétele literenként:

	10 g Bacto-Trypton (Difco)
	1 g élesztőkivonat (Difco)
	1 glükóz
	8 g NaCl
	249 mg CaCl ₂ ·2H ₂ O
TBE	89 mmól Tris, 89 mmól bórsav és 2 mmól EDTA tartalmú oldat
BSA	marhaszérum albumin
HAT	hipoxantin/aminopterin/timidin
Ig	immunglobulin
NE	nemzetközi egység (interferonaktivitás)

Az „rATP” rövidítés a ribóz-ATP kémiai pontos megnevezése (szemben a dATP rövidítéssel, amely deoxiribóz jelenlétére utal)

Mab	monoklonális antitest (monoclonal antibody)
PBS	foszfáttal pufferolt konyhasóoldat
SDS-PAGE	nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektrofórezis
5	„az érdeklődésre számot tartó frakciók” olyan frakciók, amelyek beépített linkerrel rendelkező radioaktív pBR322-t tartalmaznak
10	az „ismételt kicsapás” ugyanolyan körülmények között történik, mint az adott példában egy előbbi helyen ismertetett első kicsapás
15	a táptalajok összetétele – a fentiekben túlmenően – az E. coli, illetve az élesztők tenyésztésével foglalkozó szakember számára ismert. Pl. az „M9” táptalajt Maniatis előbbieken említett könyve a 440. oldalon részletezi; az „YNB” táptalaj a Difco Lab. cégtől szerezhető be stb.
20	a „baktériumok (sejtek) elkülönítését” centrifugálással végezzük (1. az előbbieken említett „Molecular Cloning. A Laboratory Manual” c. kézikönyvet)
25	a megadott rotor-típus (a rotor sugara), percenkénti fordulatszám és műveleti idő alapján a megfelelő „g” érték az ismert képlet segítségével számítható ki
	a „megfelelő kezelt DNS-fragmentum” olyan fragmentumot jelent, amely szekvencia tekintetében megegyezik a ³² P-vel jelölttel, de nem jelzett.

I. rész

α -2/ α -3 interferon hibridek szerkesztése és klónozásuk *Escherichia coli*

Minden alább leírt hibrid interferon-protein kódoló szekvenciát mesterségesen hozzákötünk β -laktamáz promoterhez, majd beklónozzuk a pBR322-ből származó expressziós plazmidba, amellyel E. coli HB101 törzset transzformálunk.

1. példa

Limfoblasztoid IFN α -2 és α -3 DNS-szekvenciát hordozó PvuII rezisztens vektorok szerkesztése

A pBR322 plazmidot PvuII-vel (Biolabs) hasítjuk és a lineáris DNS-t egy (³²P)-BclI linkerhez [d(ATGTGTGATCACACAT)] kapcsoljuk, amelyet szilárd fázisú foszfodiészter módszerrel szintetizáltunk (lásd: H. Rink és munkatársai, Nucleic Acids Research, 12, 6369 (1984) a következőképpen:

A hasított plazmid DNS-t (1 μ g, körülbelül 0,7 pmól) hozzákapcsoljuk ³²P-vel jelzett BclI linker DNS-hez (körülbelül 40 pmól) 50 μ l reakcióelegyen, melynek összetétele a következő: 20 mM trisz.HCl (pH= 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM rATP és 40 E/ μ l T4 DNS-ligáz (Biolabs). Az elegyet 2-3 órán át 15 °C-on inkubáljuk, ezután a vizes fázist azonos térfogatú fenol/kloroform elegyével extraháljuk, majd a DNS-t 1/9 térfogatnyi 10 $\times$ TNE és 2,5-szeres térfogatnyi etanol hozzáadásával kicsapjuk és –20 °C-on tartjuk egy éjszakán át. A DNS-üledéket 50 μ l TE oldatban (pH=8,0) reszuspendáljuk, s ezt 5–23% szacharóz gradienst [50 mM trisz.HCl (pH= 8,0), 1 mM EDTA], Kontron TST 60 rotorban centrifugáljuk 4 órán át 58000 ford/perc mellett, 15 °C-on. A gradienst felülről lefelé

szétválasztjuk és a frakciók radioaktivitását Cerenkov-számlálással határozzuk meg. A beépített linkerrel rendelkező radioaktív pBR322-t tartalmazó frakciókat egyesítjük és a DNS-t TNE-vel és etanollal csapjuk ki. A DNS-üledéket restriktációs pufferben reszuszpendáljuk és BclI-vel emésztjük, majd a vizes fázis fenol/kloroformos extrahálása után újra kicsapjuk az anyagot. A lineáris DNS-t ezután 5 µg/ml koncentráció mellett, ugyanolyan körülmények közt, mint amilyeneket a linker ligáz reakciójánál leírtunk újra gyűrűbe zárjuk.

A DNS-t (összekapcsolt) HindIII és PvuII enzimmel hasítjuk a maradék intakt pBR322 eltávolítására és PstI-el majd HindIII-PstI nagy fragmentumot (3600 bp+linker; bp=bázis pár), amely a replikációs kezdőpontot és az amp^R gént tartalmazza, szacharóz gradiensben, centrifugálással izoláljuk.

A szacharóz gradiens centrifugálással kapott CG-pBR(AP)/LyIFN-α-2 (1160 bp) és CG-pBR(AP)/LyIFN-α-3 (1020 bp) fragmentumból származó HindIII-PstI inszertumokat (76489 számú európai szabadalmi bejelentés) a fentiek szerint készített DNS-be építjük be (ligázzal), s így kapjuk a pAM4 és pAM2 plazmidot, melyek LyIFN-α-2-t, illetve LyIFN-α-3-at kódoló szakaszt tartalmaznak, β-laktamáz promoter irányítása alatt.

Ezt a DNS-t közvetlenül használjuk kompetens *E. coli* transzformálására a következőképpen: a DNS-ligázos keverékét (vagy ennek egy részét) 150 µl 15 mM trisz.HCl (pH= 7,5), 10 mM CaCl₂ 10 mM MgCl₂, 10 mM NaCl és 0:5 mM EDTA tartalmú oldatba visszük át és ehhez hozzáadjuk a kalcium-kloriddal kezelt recipiens *E. coli* HB101 sejtek 50 µl-ét. A keveréket 0 °C-on tartjuk 20 percig, ezután 42 °C-on 2 percig, majd szobahőmérsékletre való hűtés után 1 ml N-táptalajt adunk hozzá. Az inkubálást 37 °C-on folytatjuk 1 órán át (rázógépben; 250 ford/perc), ezután 600 µl-ét tetraciklin tartalmú (10 µg/ml) McConkey-agarra (Difco) szélesztjük. A Petri-csészéket 37 °C-on inkubáljuk 16–18 órán át, ekkor már megfigyelhetők a baktériumtelepek.

A transzformált sejtekből a plazmid DNS-t a következő eljárással kapjuk meg. Egy-egy transzformált telepet oltunk 10 ml tetraciklin tartalmú (10 µg/ml N-táptalajba és a tenyészetet 37 °C-on rázzuk (rázógépben; 150–300 ford/perc) addig, míg optikai sűrűsége el nem éri a 0,9–1,1 (650 nm) értéket. A sejteket leszűreljük és azonos térfogatú, tetraciklint (10 µg/ml) és klóramfenikolt (80 µg/ml) tartalmazó N-táptalajban reszuszpendáljuk. Az inkubálást 37 °C-on 18 órán át folytatjuk, hogy megnöveljük a plazmid sejtenkénti másolat számát. A baktériumokat szeparáljuk és az üledéket 50 mM-os trisz.HCl-ben (pH= 8) –10 ml/1 g nedves sejt – reszuszpendáljuk, majd annyi lizozimet (Sigma) adunk hozzá, hogy koncentrációja a végén 2 mg/ml legyen. Az oldatot 10 percig 0 °C-on tartjuk és ekkor 50 mM EDTA-t adunk hozzá, majd 10 perc múlva – 0 °C-on – Triron X100-at adunk az oldathoz 0,8% végső koncentrációig. A preparátumot ekkor 0 °C-on tartjuk 1 órán át, ezután 30 percig centrifugáljuk Sorvall SS-34 rotorban, 18000 ford/perc mellett.

A tiszta felülúszót először fenollal extraháljuk, ezután két kloroformos extrakció következik, majd RNáz A-t (Sigma) adunk hozzá 25 µg/ml végkoncentrációig. Az oldatot ezután 37 °C-on inkubáljuk 1 órán át. Az RNS eltávolítására NaCl-t (1 M végkoncentrációig) és polietilén-glikol 6000-et (7,5% végkoncentrációig) adunk az oldathoz. A preparátumot –10 °C-on tartjuk 2 órán át, ezután 10 percig centrifugáljuk Sorvall SS-34 rotorban, 10000 ford/perc mellett, 0 °C-on. Az üledéket 200 µl TNE-ben reszuszpendáljuk, újra extraháljuk fenol : kloroform (1 : 1) keverékével, ezután etanollal kicsapjuk: 500 µl etanolt adunk hozzá, 5 percig – 80 °C-on tartjuk, majd 10 percig Eppendorf-centrifugában centrifugáljuk. A DNS-üledéket 20–40 µl TE-ben reszuszpendáljuk. Ennek az eljárásnak a jellemző kitermelése mintegy 20 µg plazmid DNS.

Az izolált plazmid DNS-eket (pAM4 és pAM2) restriktációs enzim analízisnek vetjük alá, így ellenőrizzük a pAM4 és pAM2 szerkezetét.

2. példa

A 3'extracisztron PvuII hely eltávolítása a pAM4-ből

A pAM2 (α-3)-tól eltérően, a pAM4 (α-2) két PvuII helyet tartalmaz (lásd a 3. ábrát). Annak érdekében, hogy megkönnyítsük az IFN-kódoló régió belül a PvuII helyen a hibrid IFN-gének szerkesztését, az extracisztron szakaszon belüli második PvuII helyet el kell távolítani.

A pAM4 plazmidnak ez a módosítása lényegében az IFNα-2 cDNS 3'extracisztron szekvenciájának a deletálását jelenti a PstI és a 3'extracisztron PvuII helye között (lásd a 3. ábrát). A pAM4-et részlegesen emésztjük PvuII-vel [50 mM NaCl-t 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-merkapto-etanol és 10 mM trisz.HCl-t (pH= 7,5) tartalmazó oldatban 5 µg pAM4-hez 1 E/ µg PvuII-t (Biolabs) adunk, 5 percig 37 °C-on emésztjük, a reakciót fenolos extrakcióval állítjuk le] és hozzáadjuk (ligázzal) ³²P-PstI linkerhez (Collaborative Research) az 1. példában leírt eljárás szerint. A DNS keverékkel *E. coli* HB101 sejteket transzformálunk, mint fent, és 16 telep plazmidnál restriktációs enzim analízissel – PstI, PvuII és HindIII használatával – szűrővizsgálatot végzünk pontos méretű (246 bp) delécio jelenlétére. A szűrt 16 telepből háromnál a pAM4 módosulatlan volt, egy multinernek bizonyult, ötnél nagy delécio (620 bp) keletkezett és kettő hordozta a kívánt kis deléciót (246 bp). Egy rövidített IFN-α-2 inszertummal rendelkező klónt (HindIII-PstI kis fragmentum, 907 bp hosszú) szelektáltunk és pAM21-nek neveztük el.

3. példa

PvuII hibridek szerkesztése cross-over helyel a 92. aminosavnál

Mind a pAM2 (α-3), mind a pAM21 (α2) plazmidot HindIII-al és PvuII-vel hasítunk, s ennek az lesz az eredménye, hogy kihalású olyan 521 bp hosszú DNS-fragmentumokat, melyek β-laktamáz promoter szekvenciákat és az IFN-gének N-terminális felét (1–92 aminosav kódoló rész) tartalmazzák. A nagy és a kis

fragmentumot (körülbelül 4 Kb, illetve 521 bp hosszú) szacharóz gradiens centrifugálással választjuk el egymástól és a nagy fragmentumot defoszforiláljuk úgy, hogy 1 µg DNS-fragmentumokat kezelünk 30 percig 37 °C-on 50 µl 50 mmólos Tris-ben (pH= 8) borjúból alkalikus foszfátázzal, 10 pmól 5' végére 1 egységet számítva, A „B₁B₂D₃D₄” és „D₁D₂B₃B₄” hibrid IFN-géneket úgy szerkesztjük, hogy összekapcsoljuk a fent leírt megfelelő nagy és kis DNS-fragmentumokat [a pAM2-ből származó nagy HindIII-PvuII fragmentum (~4 Kb) és a pAM21-ből származó kis HindIII-PvuII fragmentum (521 bp) összekapcsolása eredményeként keletkezik a „B₁B₂D₃D₄” típusú IFN, stb.]. Az összekapcsolást ligáz segítségével végezzük, úgy, hogy 10 µl 20 mmól trisz.HCl (pH=7,8) 10 mmól MgCl₂, 10 mmól DTT, 0,5 mmól rATP, 40 E/µl T4 DNS-ligáz (Biolabs) tartalmú oldatban körülbelül 500 ng nagy DNS-fragmentumot és 20–40 ng kis DNS-fragmentumot hozunk össze. Az elegyet 5 órán át 15 °C-on tartjuk, majd a ligázos keverék 5 µl-ével transzformálunk E. coli HB101 sejteket, mint fent, s így mintegy 1000 transzformált telephez jutunk. Három telepet kiszúrunk, izoláltuk a plazmid DNS-t és HindIII, PvuII, EcoRI, TaqI és PstI enzimmel analizáltuk. Két olyan telepet szelektáltunk, amelyek a megfelelő szerkezetű plazmid DNS-t [pAM27 („B₁B₂D₃D₄”) és pAM33 („D₁D₂B₃B₄”)] tartalmazták.

4. példa

Hibrid IFN-gének szerkesztése a 150. aminosavnál megvalósított cross-overrel

A pAM2 (α-3) és a pAM21 (α-2) plazmidokat PvuII-vel és PstI-lyel emésztjük. A DNS-fragmentumokat szacharóz gradiens centrifugálással választjuk szét a PvuII-PstI nagy fragmentumra (körülbelül 4 Kb, az α-2 és α-3 IFN N-terminális 92 aminosavát kódolja) és a PvuII-PstI kis fragmentumra (386, illetve 495 bp hosszúak, az α-2 és α-3 IFN C-terminálisait kódolják). A második lépésben, a pAM2-ből és a pAM21-ből származó tisztított PvuII-PstI kis fragmentumot ³²P-vel jelezzük a következőképpen:

A DNS-fragmentumokat (~1 µg) 50 µl 50 mM-os trisz.HCl-ben (pH= 8,0) oldjuk és defoszforiláljuk alkalikus foszfátázzal úgy, hogy 10 pmól 5' végére 1 egység enzimet adunk, a kezelést 30 percig 37 °C-on végezzük. Az enzimet 1 óráig 65 °C-on való inkubálással inaktíváljuk és a DNS-t úgy tisztítjuk, hogy DEAE cellulózra adszorbeáljuk, majd eluáljuk, s az eluátumot etanollal kicsapjuk. A tisztítás körülményei: a felvitelhez használt puffer 50 mM trisz.HCl (pH=8,0) 0,15 M NaCl, 1 mM ETA; az eluáló puffer ugyanilyen összetételű. A DNS-t 20 µl reakcióelegyben foszforiláljuk, amely 50 mM trisz.HCl-t (pH= 9,5) 10 mM MgCl₂-t, 5 mM DTT-t, 30–40 µl-nyi liofilizált γ-(³²P)-ATP-t (Amersham, 6000 Ci/ mM; 1 mCi/ml) és 0,5 E/ µl T4 kinázt (P-L Biochemicals) tartalmaz. Az elegyet 20 percig 37 °C-on tartjuk, majd a reakciót 10 mM EDTA hozzáadásával állítjuk le. Ezután a megfelelő kezeletlen DNS-t (~4 µg) feleslegben adjuk a reakcióelegyhez, majd az oldatot fenollal és kloro-

formmal extraháljuk. A DNS-t a maradék γ-(³²P)-ATP-től kromatográfiásan választjuk el, Sephadex G50-nel TNE-ben. A Cserenkov-számlálással megállapított csúcs-frakciókat egyesítjük és etanollal kicsapjuk.

A ³²P-vel jelzett PvuII-PstI-fragmentumokat teljesen megamésztyük Sau3A-val, a hasított DNS-t elektroforézissel választjuk el 6%-os poliakrilamid gélben és TBE futtató puffer használatával. A gélből négy DNS-fragmentumot izoláltunk; a PvuII-Sau3A-nak megfelelő két 172 bp hosszú fragmentumot (az IFNα-2 és IFNα-3 93–150 aminosavát kódolják) és a Sau3A-PstI-nek megfelelő 214 bp, illetve 323 bp hosszú fragmentumokat (az IFN-α-2 és IFN-α-3 151–166 aminosavait kódolják).

Három megfelelő fragmentum összekapcsolása után (lásd a 2. táblázatot) 4 olyan hibrid IFN-típus keletkezett, amelyekben a 150. aminosavnál történt a cross-over. A megfelelő plazmidokat lépések sorozatán keresztül szerkesztjük meg: egy első ligáz reakcióban a PvuII-Sau3A és Sau3A-PstI DNS-fragmentumok ekvimoláris mennyiségeit kapcsoljuk össze 10 µl ligációs pufferben, amely 20 mM trisz.HCl-t (pH=7,8), 10 mM MgCl₂-t, 10 mM DTT-t, 0,5 mM rATP-t és 40 E/µl T4 DNS-ligázt tartalmaz. A reagáltatást 15 °C-on 3–6 órán át végezzük, s az eredményt a konkatamer DNS.A DNS-t PvuII-PstI-lyel emésztjük, fenol/kloroform (1 : 1) elegyével extraháljuk és a megfelelő PvuII-PstI nagy fragmentumából [defoszforilálva: 1 µg DNS-t (körülbelül 0,6 pmól 5' vég/50 µl, 50 mM-os trisz.HCl-ben) (pH=8) 0,06 egység borjúból alkalikus foszfátázzal kezelünk 30 percig 37 °C-on] feleslegben adunk hozzá, majd a DNS-t újra összekapcsoljuk ligázzal. E. coli HB101 sejteket transzformálunk a DNS-el és restriktációs analízissel (PvuII, Sau3A, TaqI és EcoRI) határozzuk meg a kívánt szerkezetű DNS-t hordozó klónokat. Ezek közül négyet kiemeltünk és a következőképpen neveztük el: E. coli HB101, pJC334, pJC337, pJC342 és pJC344 (lásd a következő oldalon a 2. táblázatot).

5. példa

A 60. aminosavnál cross-overes hibrid IFN-ek szerkesztése

Ezeknek a hibrid IFN-géneknek a szerkesztése lényegében ugyanolyan eljárással történik, ahogyan azt a 4. példában leírtuk.

A pAM2 (α-3) és a pAM21 (α-2) plazmidot HindII-al és PvuII-val hasítjuk, s a keletkező fragmentumokat szacharóz gradiens centrifugálással választjuk el. A HindIII-PvuII kis fragmentumokat (521 bp; a β-lac promotor régiót és az α-2 és α-3 IFN-ek N-terminális 92 aminosavát kódolják) ³²P-vel jelezzük és részlegesen emésztjük Sau3A-val (0,5 egység enzim/µg DNS; 5 perc, 37 °C; a reakció megállítása fenolos extrakcióval). A kapott keverékben lévő fragmentumokat elektroforézissel – 6%-os poliakrilamid gél – választjuk el. A gélből négy fragmentumot (két 424 bp HindIII-Sau3A fragmentumot és két 97 bp Sau3A-PvuII fragmentumot) vonunk ki. A három megfelelő fragmentu-

2. táblázat

A 150. aminosavnál cross-overes hibrid IFN-ek szerkesztéséhez felhasznált DNS-fragmentumok eredete (Zárójelben tüntetjük fel az IFN típusát és fragmentumon lévő IFN kódoló szakaszt)

A keletkezett hibrid IFN-típus	A klón és a plazmid jele	Összekapcsolt DNS-fragmentumok (hossza)		
		PvuII-PstI (~4 Kb)	PvuII-Sau3A (170 bp)	Sau3A-PstI (210 bp α -2) (320 bp α -3)
„D ₁ D ₂ D ₃ B ₄ ”	pJC334	Am2(α -3 ₁₋₉₂)	Am2(α -3 ₉₃₋₁₅₀)	Am21(α -2 ₁₅₁₋₁₆₆)
„D ₁ D ₂ B ₃ D ₄ ”	pJC337	Am2(α -3 ₁₋₉₂)	Am21(α -2 ₉₃₋₁₅₀)	Am2(α -3 ₁₅₁₋₁₆₆)
„B ₁ B ₂ D ₃ B ₄ ”	pJC342	Am21(α -2 ₁₋₉₂)	Am2(α -3 ₉₃₋₁₅₀)	Am21(α -2 ₁₅₁₋₁₆₆)
„B ₁ B ₂ B ₃ D ₄ ”	pJC344	Am21(α -2 ₁₋₉₂)	Am21(α -2 ₉₃₋₁₅₀)	Am22(α -3 ₁₅₁₋₁₆₆)

mot a 4. példában leírt lépcsős eljárással kapcsoljuk össze (lásd a 3. táblázatot), ezután E. coli HB101 sejtet transzformálunk, de a várt négyféle szerkezetek-

ből csak kétféle transzformált sejtet kaptunk: pAM65 („D₁B₂D₃D₄”) és pAM90 („B₁D₂B₃B₄”).

3. táblázat

A 61. aminosavnál cross-overes két hibrid IFN-gén szerkesztéséhez felhasznált DNS-fragmentumok eredete (Zárójelben tüntetjük fel az IFN típusát és fragmentumon lévő IFN kódoló szakaszt)

A keletkezett hibrid IFN	A klón és a plazmid	A DNS-fragmentumok típusa (hossza)		
		HindIII-Sau3A (424 bp)	Sau3A-PvuII (97 bp)	HindIII-PvuII (~4 Kb)
„D ₁ B ₂ D ₃ D ₄ ”	pAM65	Am2(α -3 ₁₋₆₁)	Am21(α -2 ₆₂₋₉₂)	Am2(α -3 ₉₃₋₁₆₆)
„B ₁ D ₂ B ₃ B ₄ ”	pAM90	Am21(α -2 ₁₋₆₁)	Am2(α -3 ₆₂₋₉₂)	Am21(α -2 ₉₃₋₁₆₆)

A másik két hibrid IFN- gént, amelyekben a 61. aminosavnál van a cross-over, úgy szerkesztjük meg, hogy úgy a pAM65, mint a pAM90 plazmidot HindIII-al és PvuII-vel hasítjuk és a kis HindIII-PvuII DNS-fragmentumot (521 bp) agaróz gél elektroforézis után izoláljuk. A pAM90 HindIII-PvuII kis fragmentumának és a pAM2 HindIII-PvuII nagy fragmentumának ligázzal való összekapcsolása eredményezi a pAM94-et („B₁D₂D₃D₄”) és a pAM65 HindIII-PvuII kis fragmentumának a pAM21 HindIII-PvuII nagy fragmentumával való összekapcsolása eredményezi a pAM76 plazmidot („D₁B₂B₃B₄”). A fenti négy plazmid DNS-szerkezetét restrikciós enzim analízissel erősítettük meg.

A megfelelő klónok elnevezése a következő: E. coli HB101 pAM65, pAM90, pAM94 és pAM76.

II. rész

Az α -2/ α -3 hibrid interferonok szerkesztése és klónozásuk *Saccharomyces cerevisiae*-be

Minden alább leírt hibrid interferon-proteint kódoló szekvenciát a PHO5 promoterhez és a PHO5 transzkripció terminátor szignálokhoz kapcsolunk, ezt beklónozzuk a pJDB 2 μ élesztő vektorba, amellyel a GRF18 *S.cerevisiae* törzset transzformáljuk.

6. példa

A p31RT(Δ 72) kifejező plazmid szerkesztése

A pJDB207/IF2(5₁ Δ 72 plazmidot (100561 számú európai szabadalmi bejelentés) HindIII-mal és EcoRI-

gyel emésztjük és egy 470 bp hosszú fragmentumot – ez a fragmentum tartalmazza az α -2 interferon C-terminális végét és a PHO5 transzkripció terminátor szignálokat – izolálunk agaróz gél elektroforézissel és elektroelúcióval [R. Yang és munkatársai, Methods Enzym., 68, 176 (1979)] Micro-Collodion zsákok használatával (Sartorius, Göttingen, NSZK). A p31R plazmidot (lásd a 100561 számú európai szabadalmi bejelentést) HindIII-mal és EcoRI-el emésztjük és a 4,1 Kb vektor részt ugyanezzel a technikával izoláljuk. A vektor 200 ng-ját és a DNS-inszertumot összekapcsoljuk. E. coli T4 DNS-ligáz segítségével. Az E. coli HB101 sejtek transzformálása után – az ampicillin rezisztens sejtekből – izoláljuk a p31RT(Δ 72) elnevezésű plazmidot, amely a PHO5 promotert, az α -2 interferon C-terminális végét és a PHO5 transzkripció terminátor szignálokat tartalmazza. A plazmid szerkezetét restrikciós analízissel igazoljuk.

7. példa

A pJDB207 PHO5/IFN AM104, AM114 és AM119 plazmidok szerkesztése

A p31RT(Δ 72) PHO5 expressziós plazmidot (lásd a 6. példát) EcoRI-gyel és XhoI-gyel emésztjük és a hiányos 3' végeket dCTP, dGTP, dATP és dTTP hozzáadásával, az E. coli DNS-polimeráz I Klenow fragmentja segítségével betöltjük. A tompa végeket ezután defosforiláljuk bakterialis alkalikus foszfatázzal. A pJC334, pAM90 és pJC337 plazmidokat (lásd a 4. és 5. példát)

TaqI-gyel (pJC334 és pAM90) vagy TaqI-gyel és EcoRI-gyel (pJC337) emésztjük és a 3' hiányos végeket a megfelelő dezoxinukleotidokkal töltjük be, mint fent. A körülbelül 560 bp hosszú DNS-fragmentumokat agaróz gél elektrofórézissel és elektroelúcióval – Micro Collo-dion zsákokat használva, mint fent – izoláljuk. Az előál-lított p31RT(Δ 72) plazmid vektor részének 200 ng-ját és az eluált DNS-fragmentumok 200 ng-ját T4 DNS-li-gáz segítségével összekapcsoljuk. (A „vektor rész” azt a nagy DNS-fragmentumot jelenti, amely egy jóval ki-sebb mellett a p31RT(Δ 72) plazmid EcoRI és XhoI (lásd fent) enzimekkel végzett restrikciós hasítása so-rán keletkezik. Ez a vektor DNS-molekula az ampicillin rezisztencia génje és egy replikációs origó mellett tar-talmazza a PHO5 promotert és a PHO5 terminátort. A vektor rész a klónozendő DNS-sel együtt (ez jelen eset-ben egy kb. 560 bázispár hosszúságú DNS-fragmentum, amely hibrid interferont kódol és a fent leírt módon, restrikciós emésztéssel állítható elő pJC334, pAM90 vagy pJC337 plazmidból) alkotja a rekombináns DNS-molekulát (p31R/IFN AM104, p31R/IFN AM119, p31R/IFN AM114), amely egy megfelelő gazdasejtben, pl. E. coli HB101-ben szaporítható). Az ampicillin rezisztenssé transzformált E. coli HB101 sejtekben tehát a következő plazmidok keletkeznek:

p31R/IFN AM104 (a „B₁B₂B₃D₄” hibrid interferont kódoló szekvenciát tartalmazza), p31R/IFN AM119 (a „B₁D₂B₃B₄” hibrid interferont kódoló szekvenciát tartalmazza), illetve a p31R/IFN AM114 (a „D₁D₂B₃D₄” hibrid interferont kódoló szekvenciát tartalmazza). Ha ezeket a plazmidokat BamHI-gyel és HindIII-mal hasítjuk, egy körülbelül 1300 bp hosszú, –PHO5 promotor – IFN protein kódoló szekvencia – PHO5 transzkripció terminátor szignál – konfiguráci-ójú DNS-fragmentumot kapunk, amelyet agaróz gél elektrofórézissel és elektroelúcióval izolálunk. Ezt a fragmentumot beklónozzuk a pJDB207 plazmid Hin-dIII és BamHI helye közé. Ezzel a plazmiddal transz-formáljuk a GRF18 élesztő törzset Leu⁺ tulajdonság-ra szelektálva (lásd a 100561 számú európai szabadal-mi bejelentést és a 14. példát). A létrejött klónok a következők: S.cerevisiae GRF18/pJDB207 PHO5/IFN AM104, GRF18/pJDB207 PHO5/IFN AM114 és GRF18/pJDB207 PHO5/IFN AM119.

8. példa

A pJDB207 PHO5/IFN AM129 plazmid szerkesz-tése

A pAM94 plazmidot (5. példa) teljesen elhasítjuk TaqI-gyel és részlegesen (10 µg/ml etidium-bromid je-lenlétében) EcoRI-gyel. A részleges hasítás körülmé-nyei: puffer az enzimet előállító cég javaslata szerint; 0,75 egység EcoRI/µg DNS; inkubációs idő: 40 perc, 37 °C. Egy 580 bp hosszú DNS-fragmentumot izolá-lunk agaróz gél elektrofórézissel és elektroelúcióval és hozzá kapcsoljuk a p31RT(Δ 72) plazmid EcoRI-gyel és XhoI-gyel hasított, gélben tisztított vektor részéhez (vö. a 6. példával). Az ampicillin rezisztens, transzformált E. coli HB101 sejtekből izoláljuk a p31R PHO5/IFN AM129 plazmidot. A plazmidot, amely a

„B₁D₂D₃D₄” interferon kódoló szakaszát tartalma-za, HindIII-mal és BamHI-gyel emésztjük és az 1300 bp hosszú DNS-fragmentumot bekapcsoljuk a pJDB207 plazmidba, a 7. példában leírtak szerint. A plazmiddal a GRF18 élesztő törzset transzformáljuk, mint fent. A keletkező klón neve S.cerevisiae GRF18/pJDB207 PHO5/IFN AM129 lesz.

9. példa

10 A pJDB207 PHO5/IFN AM106, AM110 és AM112 plazmidok szerkesztése

A pJDB207 PHO5/IFN AM104, AM114 és AM129 plazmidot (lásd a 7. és 8. példát) BamHI-gyel és PvuII-vel emésztjük és a 6,8 Kb hosszú vektorrészeket, ame-lyek az interferon kódoló régiók megfelelő C-terminá-lis végeit tartalmazzák, agaróz gél elektrofórézissel és elektroelúcióval izoláljuk. Hasonlóan a pJDB207/ α -2 Δ 72 (100561 számú európai szabadalmi bejelentés) plazmidot is emésztjük BamHI-el és PvuII-vel és a 800 bp hosszú DNS-fragmentumot izoláljuk. A megfe-lelő fragmentumok összekapcsolása – ligázal – után E. coli HB101 sejteket transzformálunk, s így létrejönnek a következő plazmidok: pJDB207 PHO5/IFN AM106 (a „B₁B₂B₃D₄” hibrid interferont kódoló szakaszt tar-talmazza) és AM112 (a „B₁B₂D₃B₄” hibrid interferont kódoló szakaszt tartalmazza) és AM110 (a „B₁B₂D₃D₄” hibrid interferont kódoló régiót tartal-mazza). A GRF18 élesztő törzset a szokásos módon transzformáljuk. A kapott klónok elnevezése a követ-kező: S.cerevisiae GRF18 pJDB207 PHO5/IFN AM106, pJDB207 PHO5/IFN AM112 és pJDB207 PHO5/IFN AM110.

10. példa

35 A pJDB207 PHO5/IFN DM1 és DM2 plazmidok szerkesztése

A pJDB207 PHO5/IFN AM119 plazmidot (7. példa) HindIII-al és BgIII-vel emésztjük és az interferont kó-doló régió N-terminális végét tartalmazó 7,5 Kb vektor részt agaróz gél elektrofórézis és elektroelúció segít-ségével izoláljuk. Hasonlóan a pJDB207 PHO5/IFN AM114 és pJDB207 PHO5/IFN AM104 plazmidot (lásd a 7. példát) is ugyanezen enzimekkel emésztjük és az interferont kódoló régió C-terminális végét tartal-mazó körülbelül 600 bp hosszú DNS-fragmentumot izoláljuk. A megfelelő fragmentumokat T4 DNS-ligáz segítségével összekapcsoljuk. Az E. coli HB101 sejtek transzformálása után kapjuk a pJDB207 PHO5/IFN DM1 plazmidot, amely a „B₁D₂B₃D₄” hibrid interfe-ront kódoló szakaszt tartalmazza és a pJDB207 PHO5/IFN DM2 plazmidot, amely a „B₁D₂D₃B₄” hib-rid interferont kódoló régiót tartalmazza. A GRF18 élesztő törzset a fent leírtak szerint transzformáljuk. A kapott klónokat a következőképpen neveztük el. S.cere-visiae GRF18 pJDB207 PHO5/IFN DM1 és S.cerevi-siae GRF18 pJDB207 PHO5/IFN DM2.

11. példa

60 A pJDB207 PHO5/IFN HRI43 plazmid szerkesz-tése

A pJDB207R/IF(α -2) Δ 72 plazmidot (100561 számú európai szabadalmi bejelentés) BamHI-gyel és PvuII-vel emésztjük és egy 6,8 Kb nagyságú DNS-fragmentumot izolálunk. Hasonlóan, a pJDB207R/IF(α -3) plazmidot (100561 számú európai szabadalmi bejelentés) is ugyanezen enzimekkel emésztjük és a 800 bp hosszú fragmentumot izoláljuk. A két DNS-fragmentumot összekapcsoljuk ligázzal, s az E. coli HB101 ampicillin rezisztens, transzformált sejtjeiben lévő pJDB207 PHO5/IFN HRI43 plazmid a „D₁D₂B₃B₄” hibrid interferont kódoló szakaszt tartalmazza. A kapott klón elnevezése a következő: S.cerevisiae GRF18 pJDB207 PHO5/IFN HRI43.

12. példa

A Saccharomyces cerevisiae GRF18 transzformálása és az interferontermelés indukálása

A pJDB207 PHO5/IFN AM129 („B₁D₂D₃D₄”) plazmidot bevisszük a GRF18 S.cerevisiae törzsbe (α , his 3-11, his 3-15, leu 2-3, leu 2-112, can^R) oly módon, ahogyan ezt Hinnen és munkatársai leírták [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)]. Egy μ g plazmid DNS-t adunk 100 μ l szferoplaszt szuszpenzióhoz és a keveréket polietilén-glikollal kezeljük. A szferoplasztokat 10 ml regeneráló agarral keverjük el, majd leucint nem tartalmazó élesztő-minimál-táptalajt tartalmazó lemezre visszük a sejteket. Három nap 30 °C-on való inkubáció után mintegy 1000 transzformált sejtet kapunk.

Az élesztő transzformáló lemezekről egyetlen élesztő telepet (neve: Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB PHO5/IFN AM129) emelünk ki és 10 ml élesztőminimál-táptalajt tartalmazó 100 ml-es Erlenmeyer lombikba visszük, majd 30 °C-on, 200 ford/perc mellett 24 órán át tenyésztjük, körülbelül $2-3 \cdot 10^7$ sejt/ml sűrűségig. A sejteket egyszer mossuk 20 ml alacsony P_i értékű minimál tápoldattal [Difco-féle élesztő-minimál-táptalaj, aminosavak nélkül, amelyet 20 g/l glükózzal egészítünk ki; a tápoldatot a komponensekből mi készítjük el a Difco receptje szerint (Difco Manual, Difco Laboratories, Detroit, USA), kivéve, hogy 0,03 g/l KH₂PO₄-et és 1 g/l KCl-t használunk 1 g/l KH₂PO₄ helyett]. A reszuszpendált sejtekből 3 ml-rel oltunk be 300 ml alacsony-P_i értékű minimál tápoldatot és 300 ml normál minimál táptalajt tartalmazó 1000 ml-es Erlenmeyer-lombikokat. A sejteket 30 °C-on 160 ford/perc mellett inkubáljuk. A PHO5 promotor indukálódást úgy követjük, hogy mérjük a savanyú foszfátáz aktivitás megjelenését a teljes tenyészetben [Toh-e és munkatársai, J. Bacteriol, 113, 727 (1973)]. A sejteket $1-2 \cdot 10^7$ sejt/ml sűrűségig tenyésztjük (26-30 óra inkubálás).

13. példa

Élesztősejt-kivonatok készítése és az interferon titer meghatározása

A sejteket 300 ml $1-2 \cdot 10^7$ sejt/ml sűrűségű táptalajból (12. példa) gyűjtünk össze centrifugálással, Sorvall GSA rotorban, 5 percen át 8000 ford/perc mellett, 4 °C-on. A sejteket egyszer mossuk 100 ml vízzel,

majd 6 ml jéghideg lizáló keverékben [0,1 M kálium-foszfát puffer (pH 7,4), 1% (térf/térf) Triton X-100, 0,0001 mól PMSF (Merck)] reszuszpendáljuk (PMSF-fenil-metil-szulfonil-fluorid) és átvisszük egy 30 ml-es Corex-csőbe. A szuszpenziót újra centrifugáljuk 5 percig Sorvall SS-34 rotorban 8000 ford/perc mellett, 4 °C-on és az üledéket 3 ml lizáló keverékben reszuszpendáljuk 0 °C-on. A sejtekhez 4 g üveggyöngyöt (0,4 mm átm.) adunk, s a szuszpenziót Vortex-keverőben (Scientific Instruments, Inc., USA) rázzuk 30 másodpercig teljes sebességgel, majd 1 percig jég-fürdőben hűtjük. Ezt a rázásos eljárást 5-10-szer ismételjük, amíg a sejtek több mint 90%-a feltáródik (fénymikroszkóp alatt ellenőrizzük). A sejttermelékeket és az üveggyöngyöket centrifugálással – 10 perc, 8000 ford/perc, 4 °C, Sorvall HB-4 rotor – távolítjuk el az oldatból. A felülúszót Eppendorf-csövekbe töltjük át, folyékony nitrogénben fagyaszttjuk és -60 °C-on tároljuk. Az interferonaktivitását S. Rubinstein és amunkatársai szerint [J. Virol., 37, 755 (1981)] mérjük. Az eredmény $7 \cdot 10^9$ egység/ml sejt kivonat volt.

A 12. és 13. példában leírtakkal analóg módon transzformáljuk a S.cerevisiae GRF18 törzset az alábbi plazmidokkal: pJDB207 PHO5/IFN AM119 („B₁D₂B₃B₄”), AM106 („B₁B₂B₃D₄”), AM112 („B₁B₂D₃B₄”), DM1 („B₁D₂B₃B₄”), DM2 („B₁D₂D₃B₄”), AM110 („B₁B₂D₃D₄”) és HRI43 („D₁D₂B₃B₄”). A transzformált törzseket tenyésztjük. A sejteket leszűreteljük és az interferon titereket, mint fent, meghatározzuk. Az IFN-titerek a következők voltak: S.cerevisiae GRF18/pJDB207 PHO5/IFN AM119: $5 \cdot 10^9$ egység/ml S.cerevisiae GRF18/pJDB207 PHO5/IFN AM106: $7 \cdot 10^7$ egység/ml S.cerevisiae GRF18/pJDB207 PHO5/IFN AM112: $2 \cdot 10^8$ egység/ml S.cerevisiae GRF18/pJDB207 PHO5/IFN DM1: $3 \cdot 10^9$ egység/ml S.cerevisiae GRF18/pJDB207 PHO5/IFN DM2: $5 \cdot 10^9$ egység/ml S.cerevisiae GRF18/pJDB207 PHO5/IFN AM110: $3 \cdot 10^8$ egység/ml S.cerevisiae GRF18/pJDB207 PHO5/IFN HRI 43: $1 \cdot 10^9$ egység/ml.

Ugyanilyen körülmények között a S.cerevisiae GRF18/pJDB207/IFN(α -2) és IFN(α -3) törzsek (100561 számú európai szabadalmi bejelentés) titere $1 \cdot 10^8$, illetve $3 \cdot 10^9$ egység/ml volt.

14. példa

„B₁D₂D₃D₄” hibrid interferon termelése transzformált élesztősejtek segítségével, 30 liter mennyiségben

A pJDB207 PHO5/IFN AM129 plazmidot – a plazmid a „B₁D₂D₃D₄” hibrid interferont kódoló gént a PHO5 savanyú foszfátáz promotortól lefelé (downstream) tartalmazza – hordozó GRF18 élesztőtörzset YNB (Difco lab.) agar táptalaj felületére szlesztjük. A lemezt 30 °C-on inkubáljuk, amíg a tenyészet összefolyik. Steril kacsot használva, a felületi tenyészetből egy részt átvisszünk rázott lombikba, amely az előtenyészethez szükséges IFN/21 táptalajt tartalmazza. Ennek összetétele a következő:

Élesztő kivonat (Difco)	10,0 g
L-aszparagin.H ₂ O	6,6 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,9 g
L-hisztidin	0,02 g
D-glükóz (monohidrát)	33,0 g

ad 1 liter ionmentes víz.

Az 500 ml-es lombikban egyetlen terelőlap van és 100 ml táptalajt tartalmaz. A táptalajt ionmentes vízzel készítjük, pH-ja körülbelül 6,0. A glükózt külön sterilizáljuk. Beoltás után az első előtenyésztet 24 órán át 30 °C-on inkubáljuk orbitális rázógéppben (5 cm-es lökettávolság), 250 ford/perc sebességgel. Az első lombik előtenyésztete szolgálja az oltóanyagot a második előtenyésztő lombikok számára. Ezek a lombikok 1% (térf/térf) inokulumot kapnak. A táptalaj és a tenyésztési feltételek azonosak az első előtenyésztetével. A második előtenyésztő fázisból annyi lombik tartalmát egyesítjük, hogy elég legyen 1%-nyi (térf/térf) inokulumhoz a 30 literes fermentor részére (fermentoronként három lombik). A termelő fermentor hasznos térfogata 30 liter, négy terelőlapattal és egyetlen hatlapátos tárcsás turbina keverővel – átmérője 115 mm – van ellátva. Keverési sebessége: 400 ford/perc; levegőztetés: 1 térf/térf/perc; túlnyomás: 0,3 bar. A fermentálás hőmérséklete 30 °C. A fermentort az IFN23 táptalajjal együtt sterilizáljuk. A táptalaj összetétele:

Élesztő kivonat (Difco)	2,0 g
L-aszparagin.H ₂ O	6,6 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 g
L-hisztidin	0,02 g
D-glükóz (monohidrát)	33,0 g

ad 1 liter ionmentes víz.

A glükózt külön sterilizáljuk és úgy adagoljuk, hogy 30 liter legyen a végső térfogat.

Beoltás után a fermentlé pH-ját ellenőrizzük és hogy ne essen a pH=6,0 alá, nátrium-hidroxid adagolást végzünk. A fermentáció időtartama körülbelül 18 óra, illetve addig tart, amíg el nem érjük a maximális interferonkihozatalt.

Az optikai sűrűség, amely kényelmes mértéke az élesztő növekedésének, a 6–7 OD értéket éri el. A glükóz nagymértékben fogy, de nem fogy el teljesen. A savanyú foszfát indukálódik, s ezzel együtt jár az interferon termelődése.

Az interferon titer meghatározható a nyers extraktumokból, amelyet a laboratóriumban, mechanikai sejtfeltárással készíthetünk el. A nyers kivonat literenként $7 \cdot 10^9$ egységet és megközelítőleg 1 mg/ml proteint tartalmaz.

A fermentáció befejeztével a fermentlevet – amennyiben ez szükséges – 10 °C-ra hűtjük le a lefejtés és a hibrid interferon kinyerése előtt.

A 30 liter tenyésztet – pH-ja 6,0 – 10 °C-ra hűtjük és a sejteket Sharples-centrifugában szeparáljuk. A tiszta felülúszóban nincs IFN-aktivitás. A kapott sejt-massza térfogatát X-pufferrel [mM Tris (pH=8,0),

5 mM EDTA, 0,5 mM NaCl, 20 mM PMSF] 1400 ml-re és pH=8,0-ra állítjuk be. A szuszpenziót 5–10 °C-ra hűtjük és egy DYNO-malomban (KDL Pilot típus; 0,6 liter) tárjuk fel a sejteket. A malom poliuretán keverőtárcsákkal és 500 ml üveggyönggyel (0,5–0,75 mm átm.) van ellátva, keverési sebessége 3000 ford/perc, az adagolás sebessége: 10 liter/óra. A szuszpenzió pH-ja 8. A feltárt sejteket tartalmazó szuszpenziót centrifugálással derítjük 4 °C-on, Sorvall 6SA rotorban, 12000 ford/perc mellett, 20 percig.

A pJDB207 PHO5/IFN AM119, AM106, AM112, DM1, illetve DM2 plazmidot hordozó *S.cerevisiae* GRF18 törzset ugyanígy tenyésztjük és a megfelelő hibrid interferont tartalmazó derített oldatot ugyanígy állíthatjuk elő.

15. példa

Az *E. coli* HB101/pAM94 törzs kivonatának előállítás és az IFN-aktivitás meghatározása

E. coli HB101/pAM94 törzset tenyésztünk, amíg a tenyésztet sűrűsége – 650 nm-en mérve – el nem éri a 8-as értéket. A tenyésztést 1 liter M9 táptalajban végezzük, amely 0,4% kazein eredetű aminosavakat és 2% glükózt tartalmaz. A sejteket ülepítjük és pufferben reszuszpendáljuk (16 g sejt 160 ml pufferben). A puffer összetétele: 0,1 μ trisz.HCl (pH=8,0), 0,5 M NaCl, 5 mM EDTA és 100 μmol PMSF. Ezután lizozimet adunk a szuszpenzióhoz 1 mg/ml végső koncentrációig. A szuszpenziót ezután 30 percen át jegeljük. A sejtek feltárását Sorvall Omnimix készülékben végezzük háromszor 60 másodperces beállítással. A feltárt sejteket tartalmazó szuszpenziót centrifugálással derítjük 4 °C-on 20 percig Sorvall 6SA rotorban, 12000 ford/perc mellett. A felülúszó IFN-aktivitását S. Rubinstein és munkatársai módszerével (lásd fent) határozzuk meg.

Azt találtuk, hogy az IFN-aktivitás $5 \cdot 10^7$ egység/ml sejt kivonat volt.

Azonos módon tenyésztettük *E. coli* HB101/pAM90, pJC334 és pJC342 törzset és az interferon titereket – mint fent – meghatároztuk. A kapott eredmények: $5 \cdot 10^8$, $5 \cdot 10^7$ és $5 \cdot 10^6$ egység/ml sejt kivonattól.

16. példa

Hibridoma sejtek előállítása

a) Az immunogén eredete: Egy részlegesen tisztított természetes humán leukocita IFN (IFNα) mintát, melynek specifikus aktivitása $13 \cdot 10^6$ NE/mg protein, használtunk az immunizálásokhoz. (Beszerezhető az Institut Pasteur-ból, I.-424 számon, a Mikroorganizmus-tenyésztetek Nemzeti Gyűjteményéből).

b) Immunizálási eljárás: Hét 10–14 hetes Balb/c nőstény egeret (Sisseln állat-farm, Svájc) immunizáltunk úgy, hogy komplett Freund adjuvánsban (Difco) emulgeált $4 \cdot 10^5$ NE IFNα-t (16.a példa) oltottunk az egerek mind a négy talpába. A 30. napon további $4 \cdot 10^5$ NE IFNα – inkomplett Freund-adjuvánsban – injekciót adtunk, majd a 60. napon emlékeztető oltást (ip.), s az injekció $6 \cdot 10^5$ NE IFNα-t tartalmazott PBS-ben. Három nap múlva kivettük a lépeket a fúzióhoz.

c) *Sejtfúzió*: Minden fúziós kísérletet G. Köhler és C. Milstein [Nature, 256, 495 (1975)] eljárása szerint végzünk, a nem-szekretáló Sp 2/0-Ag14 myeloma sejtvonalat [M. Shulman, C. D. Wilde és G. Köhler, Nature 276, 269 (1978)] használva. 10^8 lépsejtet 10^7 myeloma sejttel keverünk össze 1 ml 50%-os polietilén-glikol (PEG 1500, Serva) jelenlétében. Mosás után a sejteket 48 ml standard Dulbecco-féle minimum esszenciál tápoldatban (Gibco, No. 0422501) reszuszpendáljuk. Fúzióként $3 \cdot 10^6$ normál egér peritoneális exsudátum sejtet adunk kísérő sejtek gyanánt a szuszpenzióhoz. A sejteket 48×1 ml Costar-tartályokba osztjuk el és hetenként háromszor standard HAT szelekciós tápoldattal látjuk el őket, 3–6 héten át. Amikor a hibridoma sejtek növekedése láthatóvá válik, a felülúszókat kombinált immunprecipitációs-bioassay segítségével szűrjük (19. példa). Összesen 221 hibridomából 10 hibridomát találtunk, amelyek anti-IFN α -antitestet termeltek. A hibridoma sejteket határhígításos módszerrel klónozzuk mikrotitráló lemezekben, legalább egyszer. A 144 BS hibridomát választottuk a további vizsgálatokhoz, mivel ez különösen stabilnak bizonyult és jelentős mennyiség immunglobulint szekretált.

17. példa

A monoklonális antitest izolálása és tisztítása

8–10 hetes Balb/c egereket (Sisseln állatfarm, Svájc) ip. adott Pristane-nal (Aldrich) előkezelünk, majd 2–3 héttel később $2 \cdot 5 \cdot 10^6$ klónozott hibridoma sejttel és 0,2 ml Pristane-nal oltjuk be őket ip., 8–10 nap múlva aszcitesz folyadékot gyűjtünk, melyet lecentrifugálunk 800 g mellett és ezután -20°C -on tároljuk.

A felolvasztott aszcitesz folyadékot 50000 g mellett 60 percig centrifugáljuk, a felületén úszó zsírréteget óvatosan eltávolítjuk és a proteinkoncentrációt 10–12 mg/ml-ra állítjuk be. A nyers immunglobulin kicsapását úgy végezzük, hogy cseppenként 0,9 térfogatnyi telített ammónium-szulfátot adunk hozzá 0°C -on, majd a csapadékot 20 mM trisz.HCl/50 mM NaCl (pH=7,9) tartalmú pufferben oldjuk és ugyanezen pufferrel szemben dializáljuk. DEAE-D52 cellulóz (Whatman) kromatográfiájával – 20 mM trisz.HCl/25–400 mM NaCl (pH=7,9) puffer gradiens rendszert alkalmazva – választjuk el az immunglobulin frakciót. Az immunglobulint újra kicsapjuk ammónium-szulfáttal és a csapadékot PBS-ben oldjuk úgy, hogy a koncentráció 10 mg/ml legyen.

SDS-PAGE vizsgálat szerint a 144 BS monoklonális antitest tisztasági foka nagyobb, mint 95%.

18. példa

Monoklonális antitestek osztály- és alosztály- meghatározása

A klónozott hibridoma sejtek által termelt monoklonális antitestek osztályát és alosztályát az ismert Ouchterlony-féle agargél immundiffúziós technikával határozzuk meg, osztály- és alosztály-specifikus nyúl antitestek (Bionetics) felhasználásával. Az eredményeket enzim-immunassay-vel (ELISA) ellenőrizzük a következőképpen: mikrotitráló lemezeket fedünk osz-

tály vagy alosztály-specifikus, nyúlsérumból előállított, immunglobulinnal: tartályonként 50 μl PBS-ben 1 μg -al (Bionetics).

- A lemez szabad kötő-kapacitását 1% BSA és 0,2% NaN_3 (súly/térf.) tartalmú PBS-sel (pH=7,4) telítjük. A tartályokban monoklonális antitestet tartalmazó 100 μl -nyi mintákat inkubálunk 37°C -on 1 órán át. A lemezeket PBS-el mossuk, azután 37°C -on inkubáljuk 1 órán át olyan foszfáttal konjugált nyúl immunglobulin készítménnyel, amelynek specificitása azonos azzal az immunglobulinnal, amellyel a lemezeket fedtük. A megkötött enzimet 37°C -on 30 percig tartó inkubálással hívjuk elő az enzim szubsztrátumának – p-nitrofenil-foszfát – oldatával [1 mg/ml 10%-os dietanolamin pufferben, amely 0,5 mM MgCl_2 -t és 0,02% tömeg/térf.) NaN_3 -et tartalmaz; pH=9,8] és az optikai sűrűséget 405 nm-en mérjük. A 144 BS monoklonális antitestek az IgG $_{1\kappa}$ (kappa) osztályba tartoznak.

20. példa

Kombinált immunprecipitációs bioassay

- 50 μl nyers, természetes humán leukocita IFN-t vagy rekombináns IFN α polipeptidet (20a) példa) (10^4 NE/ml) azonos mennyiségű vizsgálandó anyaggal keverünk, például a hibridomák tenyészetének felülúszóival, vagy a tisztított monoklonális antitestek PBS-oldataival és mikrocsovekben (Eppendorf 3810) inkubáljuk a keveréket 37°C -on 1 órán át. Ezután 50 μl előzőleg betitrált nyúl-anti-egér Ig antitestet (Nordic) adunk a keverékhez, melyet ezután 37°C -on 2 órán át és 4°C -on 16 órán át inkubálunk, miközben a szabad és az IFN-hez kötött monoklonális antitestek immunkomplexeket alkotnak. A csöveket 4°C -on 5 percig centrifugáljuk 12000 ford/perc mellett. Az immun-precipitátumot egyszer mossuk 1 ml hideg pufferolt konyhasóoldattal (pH=7,2), majd 200 μl pufferolt, pH=2,2-es konyhasóoldatban oldjuk. Az ekkor felszabaduló IFN-aktivitást a J. A. Armstrong-féle [Appl. Microbiol., 21, 723 (1971)] standard bioassay segítségével határozzuk meg. A Mengo-vírus citopátiás gátlását (400 plakk-képző egység/tartály) Hep 2 sejtek ($3 \cdot 10^4$ sejt/tartály) használatával határozzuk meg, mikrotitráló lemezekben.

20. példa

Interferon specificitás meghatározása

a) A rekombináns IFN α polipeptid eredete:

- A LyIFN- α -1, LyIFN- α -2 és LyIFN- α -3 polipeptideket, amelyek rokonságban vannak az IFN α F, IFN α B, illetve IFN α D-vel, a 197047 számú magyar szabadalmi leírás (szabadalmas: CIBA-GEIGY) írja le. Az IFN α A-t a Hoffmann-La Roche cég hozza forgalomba (Roferon A). Az IFN α C és α J a 43980 számú európai szabadalmi bejelentés szerint állítható elő.

b) Az összehasonlításra használt IFN elleni monoklonális antitestek eredete:

- Az 1K2 és 2K2 monoklonális antitesteket a 2108510 számú brit szabadalmi leírás alapján állítottuk elő. Az NK2 és YOK monoklonális antitestet (Mab-t) a Celltech-től (Berkshire), az IY-1 és IY-2

Mab-t az Inter-Yeda cégtől (Izrael), az S-1, S-2, S-3 és S-4 (MAB-t dr. C. Favre-től [UNICET Dardilly, Franciaország] és az I/24 MAB-t M. Aguet-től (Zürichi Egyetem, Svájc) kaptuk.

c) A különböző monoklonális antitesteknek az IFN α szubtypusokkal szembeni reaktivitása meghatározását kombinált immunprecipitációs bioassay-vel (19.

példa) végeztük és tandem rádió-immunassay-vel D. S. Secher szerint [Nature, 290, 501 (1981)]. Az eredményeket a 4. táblázat tartalmazza.

A 144 BS, 1K2 és 2K2 monoklonális antitestek nem reagálnak humán IFN β -vel (Rentshler, Laupheim, NSZK) vagy humán IFN γ -val (Bio Science, Emmenbrücke, Svájc).

4. táblázat
Monoklonális antitestek immunprecipitációja rekombináns IFN szubtypusokkal

Monoklonális antitestek	I F N - s z u b t í p u s o k					
	A	α -2	C	α -3	α -1	J
144 BS	+	++++	+++	++++	+++	++
1K2	+++	-		+++	+	+++
2K2	++++	-	+++	++++	++	+++
NK2	++++	++++		-	++	++++
YOK	+	-		++++	-	+++
S-1	+++	+		++++	++	+
S-2	+++	-		-	-	+
S-3	+++	++++		-	++	++++
S-4	++++	-		-	+	++++
IY-1	++	+++		-		++
IY-2	++++	-		-	+	+++
I/24	++++	++++		-	++	+++

Jelmagyarázat: +++++ 100%-os kötődés
+++ 75%-os kötődés
++ 50%-os kötődés
+ 25%-os kötődés
± 10%-os kötődés
- 0%-os kötődés

35 A 4. táblázat adatai azt mutatják, hogy a 144 BS monoklonális antitest kötődési viselkedése egyedi. Mindenekfelett említésre méltó az IFN α -A-hoz való gyenge kötődése és az IFN α -2, IFN α -3 és IFN α -1 polipeptidhez való erős kötődése.

40 A 4. táblázat eredményei alapján végzett epitóp analízist az 5. táblázatban sematikusan ábrázoljuk.

Ahol nincs jel, ott nem történt meghatározás. (Az értékek körülbelüli értékek).

5. táblázat
Rekombináns IFN α szubtypusok epitóp analízise

Rekombináns IFN α szubtypus	144 BS	1K2 2K2	NK2, S-3, IY-1, I/24	YOK	S-1	S-2	S-4 IY-2
	M	A	b	á	l	t	a
	M	A	b	á	l	t	a
	M	A	b	á	l	t	a
A	x	—	XX	—	XX	—	x
α -2	XX	—	—	—	XX	—	x
α -3	XX	—	XX	—	—	—	XX
α -1	X	—	x	—	X	—	x
J	X	—	X	—	XX	—	XX

Az 5. táblázatból az a tény szűrhető le, hogy minden egyes IFN α szubtypus epitóp kombinációja egyedi. Ezenkívül ennek a vizsgálatnak az alapján előre meg lehet mondani, hogy melyik a megfelelő párja a MAb-eknek a specifikus IFN α szubtypusok meghatározásánál a tandem immunassay-ben, más szubtypusok kizárásával. Például a 144 BS MAb-nek az NK2, S-3, IY-1 vagy I/24 MAb bármelyikével való kombinációja alkalmas lesz az IFN α B kimutatásánál anélkül, hogy az IFN α D-vel interferálna és a 144 BS MAb-nek a YOK MAb-el való kombinációja az IFN α D kimutatására lesz használható IFN α B jelenlétében.

21. példa

Immunadszorbens oszlop készítése

Egy ml ülepített Affi-Gel 10-et (Bio-Rad) 17 mg 144 BS monoklonális antitesthez kötünk a gyártó cég előírásai szerint: az Affi-Gel 10-et zsugorított üveg-szűrőn mossuk, először hideg desztillált vízzel, majd 0,1 M NaHCO₃ oldattal (pH=8,0; kapcsoló-puffer). A gél 50%-os szuszpenzióját – kötő-pufferben – műanyag csőbe öntjük, azonos mennyiségű tisztított MAb-oldattal hozzuk össze és 4 órán át szobahőmérsékleten kevertjük. Kötődés után a gél a kötő-pufferrel mossuk és a lereagálatlan helyek blokkolása érdekében 0,1 ml 1 M etanolamin.HCl-dal (pH=8,0) kezeljük 1–2 órán át szobahőmérsékleten. A gél PBS-el mossuk 10 mM NaN₃ jelenlétében és eközben 4 °C-on tartjuk.

22. példa

Rekombináns IFN α tisztítása

immunaffinitáskromatográfiával

A rekombináns IFN α -t termelő feltárt E. coli sejt-példánál E. coli HB101/pAM94 (vö. a 15. példával) – szuszpenzióját centrifugálással derítjük Sorvall 6SA rotorban, 4 °C-on, 20 percen át, 12000 ford/perc mellett. Polietilén-imint (Polymix P, Fluka, pH=8,0) adunk a felülúszóhoz 0,25% (súly/térf.) végső koncentrációig. Az oldatot 1 óra hosszat keverjük, majd centrifugáljuk. Az üledéket eldobjuk és a felülúszóhoz szilárd ammónium-sulfátot adunk 65%-os telítésig. Az anyagot 1 órán át keverjük, majd centrifugáljuk. A felülúszót eldobjuk és az üledéket egytized térfogatnyi (15–20 ml) PBS-ben (pH=7,2) szuszpendáljuk. Az oldatot egy éjszakán át dializáljuk 0,02% NaN₃-et tartalmazó PBS-sel szemben.

A dializált oldatot 1 ml 21. példa szerinti immunaffinitás géllal keverjük el. A keveréket gyengén rázzuk 1 óra hosszat, majd oszlopba töltjük és ezután egymás után mossuk 5 oszlop-térfogat PBS-sel, 5 oszlop-térfogat 0,5 M NaCl és 0,2% Triton X-100 tartalmú PBS-sel, majd 5 oszlop-térfogat PBS-sel. Vagy: az immunaffinitás gélét először betöltjük az oszlopba, majd a dializált oldatot rávisszük a tetejére és ezután mossuk úgy, ahogy leírtuk. A rekombináns hibrid IFN α -t („B₁D₂D₃D₄”) 0,1 M citromsavat és 0,3 M NaCl-t tartalmazó savanyú pufferrel (pH=2,5) eluáljuk. Az aktív IFN-frakciókat 1 M Trisszel semlegesítjük, PBS-sel szemben dializáljuk, ezután ultraszűrővel kb.

0,1 mg/ml fehérje tartalomig koncentrálnak XM10 membránokon (Amicon Corp.; flat bed membranos).

A 21. példa szerinti 17 mg 144 BS MAb-t tartalmazó immunadszorbens oszlop maximális kapacitása IFN α -2 és IFN α -3 polipeptidre körülbelül 1,2 mg, IFN α -1 típusú polipeptidre legalább 0,8 mg „B₁B₂D₃B₄” hibrid interferonra 1,15 mg, „B₁D₂B₃B₄” hibrid interferonra 1,25 mg, „B₁D₂D₃D₄” hibrid interferonra 1,25 mg, „B₁B₂B₃D₄” hibrid interferonra 0,44 mg, „B₁D₂B₃D₄” hibrid interferonra 1,15 mg, „B₁D₂D₃B₄” hibrid interferonra 1,6 mg, „B₁B₂D₃D₄” hibrid interferonra 1,15 mg és „D₁D₂B₃B₄” hibrid interferonra 1,25 mg. Az immunadszorbens gélét legalább 50 elválasztáshoz fel lehet használni kapacitásvesztés nélkül. Az ezzel a módszerrel tisztított rekombináns IFN α -2, IFN α -3 és IFN α -1 típusú polipeptidek SDS-PAGE-el homogénnek bizonyultak.

23. példa

Immunodot analízis

Az immunodot analízist R. Hawkes és munkatársai [Anal. Biochem., 119, 142 (1982)] szerint végezzük. A természetes vagy rekombináns interferonok mintáit – különböző koncentrációkban – nitrocellulóz lapokra cseppentjük. A pontnyi cseppeket levegővel szárítjuk be és a nitrocellulóz fennmaradó kötő-kapacitását egy 10% lószérum tartalmú trisz pufferrel (0,15 M NaCl, 0,01 M trisz.HCl; pH=7,6) blokkoljuk. A nitrocellulóz csíkokat a 144 BS MAb oldatával (23 µg/ml) inkubáljuk, valamint összehasonlításhoz az azonosan készített 2K2 MAb oldattal (30 µg/ml), negatív kontrollként normál egér immunoglobulin oldattal (1 : 100 hígításban) vagy pozitív kontrollként anti-humán interferon-poliklonális egér szérummal (Enzo; 1 : 1000 hígításban). Mosás után a csíkokat peroxidázzal jelzett nyúl anti-egér immunoglobulinnal (Nordic; 1 : 400 hígításban) kezeljük és a lekött második antitestet a peroxidáz szubsztrátumával, 4-kloro-1-naftollal, hívjuk elő.

A monoklonális antitest az IFN α D típusú polipeptideket (ilyen az IFN α -3) egészen 0,4 ng/folt koncentrációig festi meg, az IFN α B típusú polipeptideket (ilyen az IFN α -2) 10 ng/folt koncentrációig, míg a 2K2 MAb csak az IFN α D típusú polipeptideket ismeri fel (4 ng/folt).

24. példa

Bead-radioimmun-tandem-assay

a) A 144 BS monoklonális antitest jelzése ¹²⁵I-dal:

A 144 BS MAb 0,1 mg-ját ¹²⁵I-nátrium-jodiddal (1 mCi) és klóramin-T-vel jódozzuk. F. C. Greenwood és munkatársai [Biochem. J., 89, 114 (1963)] standard módszerével. A reakcióterméket ioncserélő oszlopon (Bio-Rad AG; 1 × 8) tisztítjuk és aktivitását 4-10⁵ cpm/ml-re állítjuk be PBS-sel való hígítással. A 2K2 MAb jódozását hasonló módon végezzük el. A radioizotóppal jelzett YOK és NK2 monoklonális antitestet a kereskedelemről, a Celltech-től beszerezhetjük.

b) A 144 BS monoklonális antitest kötése makrogyöngyökhöz:

Polisztirol gyöngyöket (6,3 mm átm., Sphero AG, Zürich) inkubálunk 4 °C-on 16 órán át óvatos himbálással egy olyan PBS kötő-pufferben (pH=8), mely 5 mM EDTA-t, 0,1% NaN₃-ot és 1 mg/ml 144 BS MAb-et tartalmaz. Az oldat 10 ml-ére 20 gyöngy jusson. A fedett gyöngyöket ezután blokkoló pufferbe – 10% lószérumot és 0,1% NaN₃-ot tartalmazó PBS – visszük át és ebben tartjuk felhasználásig, legalább 24 óráig, 4 °C-on.

A többi MAb kötést ugyanígy végezzük.

c) Vizsgálási eljárás:

Műanyag csöveket (Falcon, 5 ml) fedünk 0,5 ml 10% lószérumot és 0,1% NaN₃-ot tartalmazó PBS blokkoló pufferrel egy éjszakán át. A puffert leszívással távolítjuk el, majd közvetlenül a cső aljába beviszünk 0,2 ml-t, blokkoló pufferben, az IFN-tartalmú vizsgálandó vagy standard oldatból. A 24. b) példa szerint MAb-vel fedett és blokkolt gyöngyöt hamar megszáritjuk egy tiszta kendőn és óvatosan átvisszük – a habképződést elkerülve – az IFN-oldatot tartalmazó csőbe. A gyöngyöt 4–6 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk óvatosan himbálással. Az IFN-oldatot leszívással távolítjuk el és minden gyöngyöt háromszor mosunk 2 ml blokkoló pufferrel. A gyöngyöt ezután 0,2 ml ¹²⁵I-dal jelzett második antitest – 8·10³ cpm – oldatával (24a) példa) inkubáljuk 16 órán át 4 °C-on, majd háromszor mossuk PBS-sel és új csőbe vesszük át a számláláshoz.

A 6. táblázatban az IFNα-3 és IFNα-2 standard oldatainak a szilárd fázisú (gyöngyhöz kötött) első antitest és a ¹²⁵I-dal jelzett második antitest különböző kombinációival kapott eredményeit mutatjuk be.

6. táblázat

Megfelelő monoklonális antitest kombináció kiválasztása az IFNα-2 és IFNα-3 polipeptid vizsgálatához

Szilárd fázisú antitest	Izotóppal jelzett második antitest	10 ³ NE/ml-re kapott beütések száma (cpm)	
		IFNα-3	IFNα-2
144 BS	2K2	113	105
144 BS	144 BS	103	58
144 BS	YOK	16,793	313
144 BS	NK2	78	3,733
2K2	144 BS	52	2
poliklonális ^x	144 BS	1,572	546

^x poliklonális: gyöngyhöz kötött poliklonális birka anti-IFN-α-antitest (Celltech)

Az IFNα-3 kimutatására a legjobb eredményeket a 144 BS MAb-nak a YOK MAb-el való kombinációjával kaptuk, az IFNα-2 kimutatásához a 144 BS MAb és a NK2 kombinációja bizonyult a legjobbnak.

A 4. ábra bemutatja a szilárd fázishoz kötött 144 BS MAb és a radioizotóppal jelzett NK2 MAb kombinációjával végzett kvantitatív titrálási kísérlet eredményét. A vizsgálat lineáris összefüggést mutat az IFNα-B típusú polipeptidek koncentrációjával –1–5000 NE/ml, azaz 2 pg/ml – 10 ng/ml tartományban – függvényében. Az IFNα-2 és a „Standard αB” típusú polipeptid (Celltech) titrálási görbéje közti különbségeket a két IFN-készítménynél végzett bioassay-nél kapott különbségnek tulajdonítjuk.

Hasonló eredményeket kaptunk az IFNαD polipeptidek kvantitatív mérési kísérleteinél, a szilárd fázishoz kötött 144 BS MAb és a jelzett YOK MAb kombinációjával. A meghatározás megbízhatóan kimutat 1 NE/ml (2 pg/ml) IFNα típusú polipeptideket. A szilárd fázishoz kötött 144 BS MAb és a NK2 MAb kombinációját fel lehet használni IFNαF típusú polipeptidek meghatározására is.

d) Rövidített vizsgálati eljárás (szimultán meghatározás):

A 24c) példában leírt általános módszert használva, a MAb-vel fedett gyöngyöt 3 órán át szobahőmérsékleten inkubáljuk a vizsgálandó oldattal (0,1 ml) és a radioaktív izotóppal jelzett második antitesttel (0,1 ml) együtt, kihagyva a közbülső mosásokat.

Az 5. ábrán látható, hogy a rövidített szimultán-meghatározás megbízhatóan használható olyan IFNαB típusú polipeptid (ilyen az IFNα-2) minták gyors szűrésére, amelyek 150 NE/ml-t, vagy ennél többet tartalmaznak, de ez a módszer jelentősen kevésbé érzékeny, mint a 24c) példában leírt eljárás.

e) Tesztelés a bead-radio-immun-tandem-assay-hez:

A 24c) példában leírt meghatározáshoz való teszt-készlet tartalma a következő:

- 100 db 5 ml-es Falcon műanyag cső,
- 100 db 6,3 mm átmérőjű, 144 BS monoklonális antitesttel fedett polisztirol gyöngy 10% lószérum és 0,1% NaN₃ tartalmú PBS-ben,
- 20 ml ¹²⁵I-dal jelzett YOK monoklonális antitest, specifikus aktivitása 4·10⁵ cpm/ml,
- 2 ml 10⁴NE/ml tartalmú standard IFNα-1 oldat,
- 2 ml 10⁴NE/ml tartalmú standard IFNα-2 oldat,
- 2 ml 10⁴NE/ml tartalmú standard IFNα-3 oldat,

1000 ml 10% lószérumot és 0,1% NaN_3 -ot tartalmazó PBS, kalibrációs görbe.

25. példa

Enzim-immunassay (ELISA)

a) A 144 BS monoklonális antitest jelzése alkalikus foszfatázzal:

1,4 PBS-ben oldott 1,4 mg 144 BS MAb-t 5 mg alkalikus foszfatázzal (Sigma P6774, VII-T típus) tartalmazó oldattal reagáltatunk 2 óra hosszat Voller és munkatársai [Bull. World Health Organ., 53, 55 (1976)] standard módszere szerint 0,2%-os (térf/térf.) glutáraldehid használatával. A konjugátumot 5 ml 1 mM MgCl_2 -t, 1% BSA-t és a 0,02% NaN_3 -ot tartalmazó 0,05 M trisz pufferbe (pH=8,0) visszük át. Az oldatot sötét helyen, 4 °C-on tartjuk.

b) A meghatározás módja:

Polipropilén mikrotitráló lemezeket (Dynatech Labs., Ind.) fedünk 150 μl (pH=8,0) pufferben (karbonáttal pufferolt, 0,02% NaN_3 tartalmú 0,9%-os konyhasóoldat) oldott NK2 monoklonális antitesttel (Celltech, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 2 óra hosszat 37 °C-on és egy éjszakán át 4 °C-on tartva a lemezeket. A lemezeket ötször mossuk PBS-sel és a még jelen lévő protein-reaktív helyeket úgy telítjük, hogy a lemezeket 1 órán át 37 °C-on 250 μl 0,2% zselatint és 0,2% NaN_3 -ot tartalmazó PBS pufferben (pH=7,4) inkubáljuk. Az ilyen módon fedett lemezek 4 °C-on néhány napig eltarthatók ebben a pufferben.

A vizsgálandó oldat vagy az IFN α szubtypusokat tartalmazó standard oldat hígításaiból 50 μl -t, 50 μl puffert (pH=7,4) és a 144 BS foszfatázzal jelzett antitest oldatából, melyet 1:100-ra hígítottunk a (pH=7,4-es pufferrel, 50 μl -t összekeverünk a mikrotitráló lemez tartályaiban és a lemezt 2 óra hosszat 37 °C-on és 30 percet 4 °C-on inkubáljuk. A lemezeket ötször mossuk PBS-sel, majd 30 percig 37 °C-on inkubáljuk 150 μl p-nitrofenil-foszfát-oldattal (10%-os dietanolamin pufferben 1 mg/ml, MgCl_2 0,5 mM; pH=9,8). Az optikai sűrűséget 405 nm-en mérjük, meghatározzuk a felszabaduló p-nitrofenolt, amely arányos a vizsgálandó oldatban lévő IFN- α szubtypus mennyiségével.

A módszert felhasználhatjuk IFN α B típusú (ilyen az IFN α -2) vagy IFN α F típusú polipeptid mennyiségi meghatározására. Az IFN α D típusú (ilyen az IFN α -3) polipeptid meghatározásakor a mikrotitráló lemezt YOK monoklonális antitesttel (Celltech) fedjük NK2 helyett.

Hasonló eredményeket kapunk, ha a mikrotitráló lemezeket 144 BS MAB-del fedjük és második antitestként foszfatázzal konjugált NK2, illetve YOK MAB-eket használunk.

c) ELISA-tesztkészlet

A 25b) példában leírt módszerhez szolgáló teszt-készlet tartalma:

polipropilén mikrotitráló lemezek,

20 μl NK2 monoklonális antitest (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) karbo-

nát pufferben (0,9% NaCl, 0,42% NaHCO_3 , 0,0072% Na_2CO_3 , 0,02% NaN_3),

1 ml alkalikus foszfatázzal konjugált 144 BS MAb (10,1 példa, 0,3 mg antitest/ml) Tris pufferben (0,05 μ

5 trisz 1 mM MgCl_2 , 1% BSA, 0,02% NaN_3 ; pH=8,0),

2 ml 10^4 NE/ml IFN α -1 tartalmú standard oldat,

2 ml 10^4 NE/ml IFN α -2 tartalmú standard oldat,

2 ml 10^4 NE/ml IFN α -3 tartalmú standard oldat,

300 ml PBS,

10 300 ml puffer; pH=7,4 (0,02% zselatin, 0,2% NaN_3 PBS-ben),

50 ml p-nitrofenil-foszfát (1 mg/ml) dietanolamin pufferben (10%; 0,5 mM MgCl_2 , 0,02% NaN_3 , a pH=8,9-re beállítva HCl-lel),

15 kalibrációs görbe,

színerősségskála.

26. példa

Hibrid interferonok tisztítása precipitációs és kromatográfias módszerekkel

20 A „B₁D₂D₃D₄” interferont tartalmazó oldat 1 literét, amelyet centrifugálással derítettünk (13–15. példa), 2 M sósavval addig savanyítjuk, míg pH-ja a 2,2 értéket el nem éri. Az oldatot 1 órán át 4 °C-on keverjük és a kicsapódott proteint centrifugálással (Sorvall GSA rotor, 12000 ford/perc, 4 °C, 20 perc) választjuk el. Az üledéket eldobjuk és a felülúszót szilárd ammónium-szulfáttal 30%-ra telítjük. Az oldatot 1 órán át 4 °C-on keverjük, majd centrifugáljuk. Az interferont

25 tartalmazó felülúszót 0,1 M ammónium-hidrogén-karbonát oldattal (pH=8,2) szemben dializáljuk. Az oldat interferonaktivitása mintegy 10^8 NE/ml volt.

30 Egy oszlopot, mely 50 ml kelátképző Sepharose 6B-t (Pharmacia) tartalmaz és amelyre a gyártó cég előírása szerint Cu^{2+} ionokat vittünk fel, kiegyensúlyozunk 250 ml 0,05 M nátrium-acetátot (pH=7,0) és 0,5 M NaCl-t tartalmazó oldattal. Ezután a dializált oldatból (lásd fent) 200 ml-t viszünk az oszlopra 4 °C-on. Az oszlopot 150 ml kiegyensúlyozó pufferrel mossuk. A megkötött interferont lineáris gradiens eluációval, 250 ml 0,05 M nátrium-acetát (pH=7,0) és 0,5 M NaCl 250 ml 0,05 M nátrium-acetát (pH=2,8) és 0,5 M NaCl oldatok használatával oldjuk le, majd mosás következik 150 ml 0,05 M nátrium-acetát (pH=2,8) és

35 0,5 M NaCl tartalmú oldattal.

40 Az aktív interferon frakciókat egyesítjük és 0,05 M trisz.HCl pufferrel (pH=8,0) szemben dializáljuk. A dializált oldat interferonaktivitása megközelítőleg 10^8 NE/ml. Az oszlop maximális kapacitása

50 „B₁D₂D₃D₄” interferonra körülbelül 75 mg.

55 50 ml Q-Sepharose anioncserélőt (Pharmacia) tartalmazó oszlopot kiegyensúlyozunk 0,05 M trisz.HCl pufferrel (pH=8,0). A fenti, dializált interferon oldatból 100 ml-t ráviszünk az oszlopra szobahőmérsékleten. Az oszlopot ezután 50 ml kiegyensúlyozó oldattal mossuk. A megkötött interferont lineáris gradiens alkalmazásával, 0–0,7 M NaCl (0,05 mólos trisz.HCl-ben, pH=8,0) eluáljuk. A tiszta interferon körülbelül 0,3 M NaCl-nál eluálódik. Az aktív frakciók SDS-PAGE-el végzett vizsgálatban egyetlen sávot adnak és

molekulasúlyuk valószínűleg 19000. Az anioncserélő oszlop maximális kapacitása a „B₁D₂D₃D₄” hibrid interferonra mintegy 5 mg.

Azonos módon tisztíthatók a következő hibrid interferonok is: „B₁D₂B₃B₄”, „B₁D₂B₃D₄”, „B₁D₂D₃B₄”, „B₁B₂B₃D₄” és „B₁B₂D₃B₄”.

27. példa

A „B₁D₂D₃D₄” hibrid interferon liofilizálása

A „B₁D₂D₃D₄” interferont, akár immunafinitáskromatográfiával – a 144 BS monoklonális antitestet használva –, akár a konvencionális kromatográfiás eljárásokkal (26. példa) tisztítottuk, 0,5 M H₄HCO₃ oldattal szemben dializáljuk, majd liofilizáljuk. A liofilizált mintához kis mennyiségű vizet adunk kétszer, hogy az NH₄HCO₃-ot teljesen eltávolíthassuk. Az oldatot ezután újra liofilizáljuk.

A „B₁D₂D₃D₄” interferon visszaoldása a következőképpen történik: annyi 0,5 M NH₄HCO₃ oldatot (pH=8,2) adunk a liofilizált anyaghoz, hogy interferon koncentrációja körülbelül 0,1 mg/ml legyen. A visszaoldott interferon vírusellenes aktivitása 2·10⁸ NE/ml volt, amely megegyezik a liofilizálás előtti értékkel.

28. példa

A hibrid interferonok fiziko-kémiai jellemzői

A találmány szerinti hibrid interferonokat és az eredeti interferonokat SDS-PAGE vizsgálatnak vetjük alá Laemmli módszere [Nature, 227, 680 (1970)] szerint. A hibrid interferonok feltételezett molekulatömegeit a 7. táblázatban foglaljuk össze (kilo-daltonban =KD). A 7. táblázat a hibrid interferonok izoelektromos pontját (pI) is feltünteti, melyet Ampholine tartalmú LKB poliakrilamid gélben határoztunk meg.

7. táblázat

A hibrid interferonok valószínű molekulatömege és izoelektromos pontja

IFN	Valószínű molekulatömeg	pI
α-2	27,000	5,2
α-3	20,000	5,2
„B ₁ B ₂ D ₃ D ₄ ”	27,000	5–6 (diffúz)
„D ₁ D ₂ B ₃ B ₄ ”	20,000	5,0
„B ₁ B ₂ B ₃ D ₄ ”	27,000	5,2
„B ₁ B ₂ D ₃ B ₄ ”	26,000	5–6 (diffúz)
„B ₁ D ₂ D ₃ D ₄ ”	19,000	5,4
„B ₁ D ₂ B ₃ D ₄ ”	20,000	5,6
„B ₁ D ₂ D ₃ B ₄ ”	20,000	5,5
„B ₁ D ₂ B ₃ B ₄ ”	20,000	5,4

A találmány szerinti hibrid interferonok aminosav szekvenciáját részben az Applied Biosystems 470 A típusú protein szekvenáló készülékével határoztuk meg, vagy a Beckman 890 C szekvenálót használtuk. Mindkét esetben automatikus Edman-degradációt végeztünk. A talált szerkezet teljesen megegyezett a várttal. Az N-terminális aminosav a cisztein.

29. példa

A hibrid interferonok hatása a (2'–5')oligo-izociaadenilát-szintetáz aktivitás szintre Daudi sejtekben

Daudi sejteket oltunk 2·10⁵ sejt/ml sűrűségben RPMI 1640 táptalajba, mely 10% fetális borjúsérumot tartalmaz és a „B₁B₂B₃D₄”, „B₁D₂B₃B₄”, „B₁D₂D₃D₄” és „B₁B₂D₃B₄” hibrid interferonokat a 8. táblázatban megadott koncentrációkban, 24 óra múlva az 5·10⁶ sejtet tartalmazó mintákat lecentrifugáljuk (9000 ford/perc), s a sejteket 500 µl hideg lizáló pufferben [20 mM 4-(2-hidroxi-etil)-1-piperazin-étán-szulfonsav-puffer (pH=7,5) 5 mM MgCl₂, 120 mM KCl, 7 mM DTT, 10% glicerin, 0,5% Nonidet

40 P40] reszuszpendáljuk és 2 percig jégen inkubáljuk. A mintákat ezután újra centrifugáljuk (9000 ford/perc; 8 perc; 4 °C), a felülúszókat leöntjük és (2'–5')-oligo-izoadenilát-szintetáz aktivitásukat a következőképpen határozzuk meg: A felülúszókhoz 50 µl poli(rI).(rc) agarózt (P-L Biochemicals) keverünk 30 °C-on, majd 15 perc múlva a nem adszorbeált anyagot centrifugálással távolítjuk el. A poli(rI).(rc)-re adszorbeálódott anyagot 2,5 mM α-³²P-ATP-vel (400 Ci/mmól; Amersham International) inkubáljuk 20 órán át 30 °C-on, bakteriális alkalikus foszfatázzal (Sigma) kezeljük, majd a savanyú alumínium-oxid (300 µl acid alumina, Sigma) oszlopról 3,0 ml 1 M glicin.HCl pufferrel (pH=2,0) eluáljuk Merlin és munkatársai szerint [Analyt.Biochms., 110, 190 (1981)]. A 8. táblázatban közölt adatok azt fejezik ki, hogy hány-szorosára nőtt a (2'–5')-oligo-izoadenilát-szintetáz aktivitás az interferonnal kezelt sejtekben a kezeletlen, kontroll sejtek enzim-aktivitás szintjéhez (átlag-aktivitás: 51,6 ± 8,7 pmól/hr/10⁵ sejt) képest.

60-

8. táblázat

(2'-5')-oligo-izadenilát-szintetáz aktivitás növekedés (beépült ATP pmól/hr/10 ⁵ sejt)				
IFN koncentráció (egység/ml)	1	10	100	1000
IFN α-2 („B”)	3,6	4,0	5,7	5,6
α-3 („D”)	2,2	3,2	3,2	3,9
„B ₁ B ₂ D ₃ D ₄ ”	3,4	3,2	4,6	4,0
„D ₁ D ₂ B ₃ B ₄ ”	2,6	2,1	4,8	4,3
„B ₁ B ₂ B ₃ D ₄ ”	9,4	8,4	10,0	8,5
„B ₁ D ₂ B ₃ B ₄ ”	5,6	5,7	7,8	11,4
„B ₁ D ₂ D ₃ D ₄ ”	5,8	8,9	12,1	17,5
„B ₁ B ₂ D ₃ B ₄ ”	5,6	7,0	9,1	9,6

30. példa

Gyógyszerkészítmény (parenterális alkalmazásra)

A „B₁D₂D₃D₄” hibrid interferon – specifikus aktivitása 1,3·10⁸ egység/ml humán WISH sejteken – 2 mg-ját 30 ml 5n humán szérumban oldunk fel. A kapott oldatot baktériumszűrőn engedjük át és a szűrt oldatot aszeptikus körülmények között elosztjuk 100 flakóban úgy, hogy mindegyik 2,6·10⁶ egység tiszta hibrid interferont tartalmazzon. A parenterális alkalmazásra megfelelő flakókat célszerűen hűtőben, például –20 °C-on tároljuk.

Hasonló módon készíthetünk 5,2·10⁶ vagy 1,04·10⁷ egységet tartalmazó flakókat, 4 vagy 8 mg hibrid interferon felhasználásával.

Azonos módon készíthetünk „B₁D₂B₃B₄”, „B₁B₂D₃B₄”, „B₁D₂B₃D₄”, „B₁D₂D₃B₄” vagy „B₁B₂B₃D₄” hibrid interferont tartalmazó flakókat (specifikus aktivitásuk 1,28·10⁸, 2,10⁸, 7,7·10⁷, 3,8·10⁷, illetve 8·10⁷).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás hibrid interferon polipeptidok és ezeket tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására, amelyeknek az aminosav szekvenciája 2–4 olyan al-szekvenciából áll, amelyek az aminosavak azonosságát és számát illetően megfelelnek a LyIFN-α-2 és LyIFN-α-3 humán limfoblasztoid interferonok al-szekvenciáinak, *azzal jellemezve*, hogy prokarióta vagy élesztő gazdasejteket transzformálunk olyan hibrid vektorral, amelynek összetétele a következő:

- egy promotor,
- egy hibrid interferon polipeptidet kódoló DNS-szekvencia, amely DNS-szekvenciaként a következő polipeptideket kódoló DNS-szekvenciák valamelyikét alkalmazzuk:

polipeptid, amelynek aminosav szekvenciáját a LyIFN-α-2 1–150 aminosava és a LyIFN-α-3 151–166 aminosava alkotja;

polipeptid, amelynek aminosav szekvenciáját a LyIFN-α-2 1–92 aminosava, a LyIFN-α-3 93–150 aminosava és a LyIFN-α-2 151–166 aminosava al-

20 kotja; vagy

polipeptid, melynek aminosav szekvenciáját a LyIFN-α-2 1–60 aminosava, a LyIFN-α-3 61–92 aminosava, a LyIFN-α-2 vagy LyIFN-α-3 93–150 aminosava és a LyIFN-α-2 vagy LyIFN-α-3 151–166 aminosava alkotja, amely DNS-szekvenciát az említett promotor ellenőrzi, és a vektor DNS-t tartalmazó gazdasejtet tenyésztjük és az amlített hibrid interferont izoláljuk és adott esetben, gyógyszerkészítmény előállítására a kapott hibrid interferont gyógyászati szempontból elfogadható vivóanyaggal és/vagy adalékanyaggal keverjük össze.

2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a DNS-szekvenciát az alábbi hibrid interferon polipeptideket kódoló DNS-szekvenciák közül választjuk ki:

– „B₁B₂B₃D₄” hibrid interferon polipeptid, szerkezete a következő:

40 –
CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
45 GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR
LYS ASP SER SER ALA ALA LEU ASP GLU THR
LEU LEU ASP GLU PHE TYR ILE GLU LEU ASP
50 GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU SER CYS VAL
MET GLN GLU VAL GLY VAL ILE GLU SER PRO
LEU MET TYR GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL
ARG LYS TYR PHE GLN ARG ILE THR LEU TYR
LEU THR GLU LYS LYS TYR SER SER CYS ALA
55 TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET
ARG SER LEU SER LEU SER THR ASN LEU GLN
GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU,

– „B₁B₂D₃B₄” hibrid interferon polipeptid, szerkezete a következő:

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR
LYS ASP SER SER ALA ALA LEU ASP GLU THR
LEU LEU ASP GLU PHE TYR ILE GLU LEU ASP
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
MET GLN GLU GLU ARG VAL GLY GLU THR
PRO LEU MET ASN ALA ASP SER ILE LEU ALA
VAL LYS LYS TYR PHE ARG ARG ILE THR LEU
TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS
ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE
MET ARG SER PHE SER LEU SER ILE ASN LEU
GLN LYS ARG LEU LYS SER LYS GLU,

- „B₁D₂B₃D₄” hibrid interferon polipeptid, szerke-
zete a következő:

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR
LYS ASP SER SER ALA ALA TRP ASP GLU ASP
LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU SER CYS VAL
MET GLN GLU VAL GLY VAL ILE GLU SER PRO
LEU MET TYR GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL
ARG LYS TYR PHE GLN ARG ILE THR LEU TYR
LEU THR GLU LYS LYS TYR SER SER CYS ALA
TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET
ARG SER LEU SER LEU SER THR ASN LEU GLN
GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU,

- „B₁D₂D₃B₄” hibrid interferon polipeptid, szerke-
zete a következő:

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR
LYS ASP SER SER ALA ALA TRP ASP GLU ASP
LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
MET GLN GLU GLU ARG VAL GLY GLU THR
PRO LEU MET ASN ALA ASP SER ILE LEU ALA
VAL LYS LYS TYR PHE ARG ARG ILE THR LEU
TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS
ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE
MET ARG SER PHE SER LEU SER ILE ASN LEU
GLN LYS ARG LEU LYS SER LYS GLU,

- „B₁D₂D₃D₄” hibrid interferon polipeptid, szerke-
zete a következő:

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR
LYS ASP SER SER ALA ALA TRP ASP GLU ASP
LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
MET GLN GLU GLU ARG VAL GLY GLU THR
PRO LEU MET ASN ALA ASP SER ILE LEU ALA
VAL LYS LYS TYR PHE ARG ARG ILE THR LEU
TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS
ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE
MET ARG SER LEU SER LEU SER THR ASN LEU
GLN GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU,

- „B₁D₂B₃B₄” hibrid interferon polipeptid, szerke-
zete a következő:

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY
ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN
MET ARG ARG ILE SER PRO PHE SER CYS LEU
LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN
GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET
ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR
LYS ASP SER SER ALA ALA TRP ASP GLU ASP
LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR
GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU SER CYS VAL
MET GLN GLN VAL GLY VAL ILE GLU SER PRO
LEU MET TYR GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL
ARG LYS TYR PHE GLN ARG ILE THR LEU TYR
LEU THR GLU LYS LYS TYR SER SER CYS ALA
TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET
ARG SER PHE SER LEU SER ILE ASN LEU GLN
LYS ARG LEU LYS SER LYS GLU.

3. Az 1. igénypont szerinti eljárás a „B₁B₂B₃D₄”
hibrid interferon előállítására, *azzal jellemezve*, hogy
a szóban forgó hibrid interferont kódoló DNS-szek-
venciát tartalmazó hibrid vektort alkalmazunk.

4. Az 1. igénypont szerinti eljárás a „B₁B₂D₃B₄”
hibrid interferon előállítására, *azzal jellemezve*, hogy
a szóban forgó hibrid interferont kódoló DNS-szek-
venciát tartalmazó hibrid vektort alkalmazunk.

5. Az 1. igénypont szerinti eljárás a „B₁D₂B₃D₄”
hibrid interferon előállítására, *azzal jellemezve*, hogy
a szóban forgó hibrid interferont kódoló DNS-szek-
venciát tartalmazó hibrid vektort alkalmazunk.

6. Az 1. igénypont szerinti eljárás a „B₁D₂D₃B₄”
hibrid interferon előállítására, *azzal jellemezve*, hogy
a szóban forgó hibrid interferont kódoló DNS-szek-
venciát tartalmazó hibrid vektort alkalmazunk.

7. Az 1. igénypont szerinti eljárás a „B₁D₂D₃D₄”
hibrid interferon előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

a szóban forgó hibrid interferont kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó hibrid vektort alkalmazunk.

8. Az 1. igénypont szerinti eljárás a „B₁D₂B₃B₄2”

hibrid interferon előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a szóban forgó hibrid interferont kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó hibrid vektort alkalmazunk.

1. ábra: A LyIFN- α -3 aminosav szekvenciájának összehasonlítása

[illegible]

2. ábra: A LyIFN- α -2 és a LyIFN- α -3 kódoló szakaszainak nukleotid szekvenciája (a kódoló tripletek számozottak).

```

 $\alpha$ -2    ...GAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAATG
 $\alpha$ -3    ...GAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAATG
      1   Sau3A                                     16
 $\alpha$ -2  TGT GAT CTG CCT CAG ACT CAC AGC CTG GGT AAC AGG AGG GCC TTG ATA
 $\alpha$ -3  TGT GAT CTC CCT GAG ACC CAC AGC CTG GAT AAC AGG AGG ACC TTG ATG
                                     32
 $\alpha$ -2  CTC CTG GCA CAA ATG CGA AGA ATC TCT CCT TTC TCC TGC CTG AAG GAC
 $\alpha$ -3  CTC CTG GCA CAA ATG AGC AGA ATC TCT CCT TCC TCC TGT CTG ATG GAC
                                     48
 $\alpha$ -2  AGA CAT GAC TTT GAA TTC CCC CAG GAG GAG TTT GAT GAT AAA CAG TTC
 $\alpha$ -3  AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GAT GGC AAC CAG TTC
                                     64
                                     Sau3A
 $\alpha$ -2  CAG AAG GCT CAA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ACC
 $\alpha$ -3  CAG AAG GCT CCA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG CTG ATC CAG CAG ATC
                                     80
 $\alpha$ -2  TTC AAC CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT GCT TTG GAT GAG ACC
 $\alpha$ -3  TTC AAC CTC TTT ACC ACA AAA GAT TCA TCT GCT GCT TGG GAT GAG GAC
                                     96
                                     PvuII
 $\alpha$ -2  CTT CTA GAT GAA TTC TAC ATC GAA CTT GAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG
 $\alpha$ -3  CTC CTA GAC AAA TTC TGC ACC GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC TTG
                                     112
 $\alpha$ -2  GAG TCC TGT GTG ATG CAG GAA GTG GGG GTG ATA GAG TCT CCC CTG ATG
 $\alpha$ -3  GAA GCC TGT GTG ATG CAG GAG GAG AGG GTG GGA GAA ACT CCC CTG ATG
                                     128
 $\alpha$ -2  TAC GAG GAC TCC ATC CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA AGA ATC ACT
 $\alpha$ -3  AAT GCG GAC TCC ATC TTG GCT GTG AAG AAA TAC TTC CGA AGA ATC ACT
                                     144
 $\alpha$ -2  CTA TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC TCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC
 $\alpha$ -3  CTC TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC
                                     160
                                     Sau3A
 $\alpha$ -2  AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCC TTC TCT TTA TCA ATC AAC TTG CAA AAA
 $\alpha$ -3  AGA GCA GAA ATC ATG AGA TCC CTC TCT TTA TCA ACA AAC TTG CAA GAA
                                     166
 $\alpha$ -2  AGA TTG AAG AGT AAG GAA TGA GACCTGGTACAACACGGAAATGATTCTTATAGACT
 $\alpha$ -3  AGA TTA AGG AGG AAG GAA TAA CACCTGGTCCAACATGAAACAATTCTTATTGACTC

 $\alpha$ -2  AATACAGCAGCTCACACTTCGACAAGTTGTGCTCTTTCAAAGACCCTTGTCTGCCCCAAACC
 $\alpha$ -3  ATATACCAGGTCACGCTTTTCATGAATTCTGCCATTTCAAAGACTCTCACTTCTGCTATAACTA

 $\alpha$ -2  ATGCTATGTTTTGAATCAAATGTGTCAAGTGTTCAGGAGTGTTAAGCAACATCCTGTT
 $\alpha$ -3  TGACCATGCTGATAAACTGATTTATCTATTTAAATATTTATTAGCTATTTCATAAGATTT

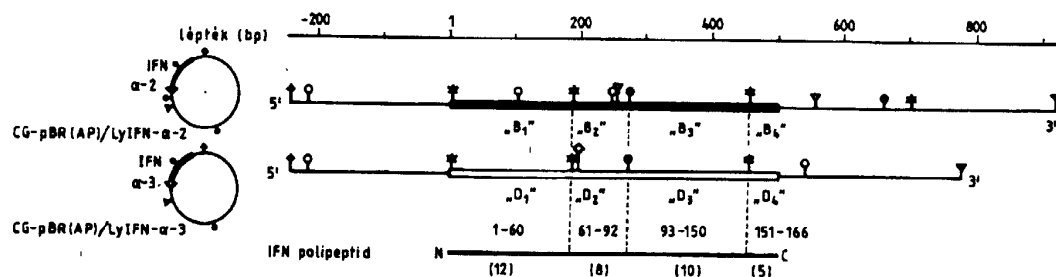
      PvuII                                     Sau3A
 $\alpha$ -2  CAGCTGTATGGGCACTAGTCCCTTACAGATGACCATGCTGATGGATCTATTCACTATTTTATT
 $\alpha$ -3  AAATTAATTTTTGTTTCATATAACATCATGTGCATCTTTACACTGTGGTTAGTGTAATAAAACAT

 $\alpha$ -2  TAAATCTTTATTAGTTAACTATCTATAGGGCTTAAATTAGTTTTGTTTCATATTATATTATGT
 $\alpha$ -3  GTTCCTTAATTTACTCAAATTCATTATTTT.....

 $\alpha$ -2  GAACTTTTACATTGTGAATTGTGTAACAAAACATGTTCTTTATATTTATTATTTTGCCTTGT

 $\alpha$ -2  TTATTAATTTTACTATAG...

```

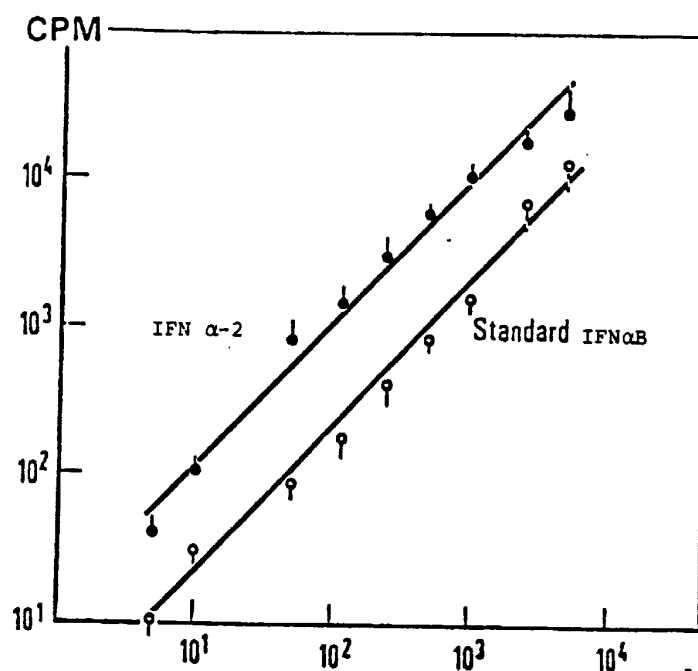


3. ábra: A CG-pBR(API)-LynIFN/alfa-2- és CG-pBR(API)/LynIFN-alfa-3 plazmid kis szegmentumainak Hind-Pst restrikciós térképe.

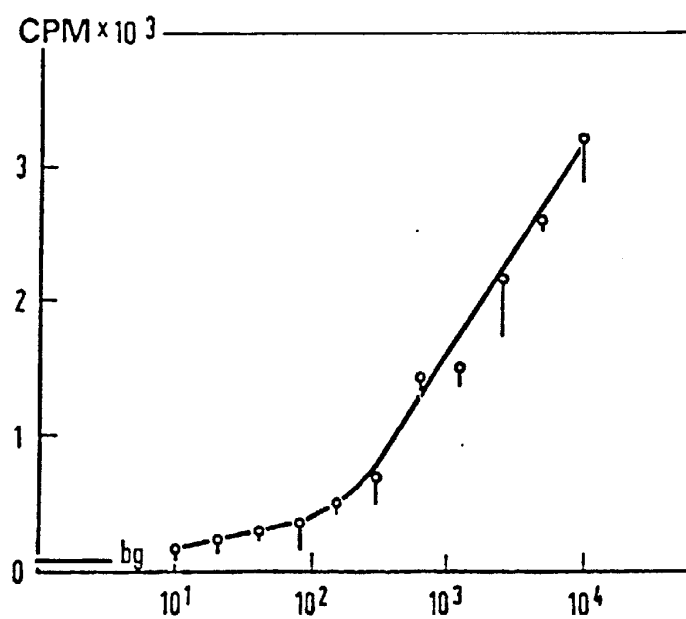
A restrikciós helyek
jelzése:

◆ Hind III ▼ Pst I ○ Eco R1 ▼ Taq
● Pvu II * Sau 3A ◇ Bgl II

3. ábra



4. ábra



5. ábra

Kiadja az Országos Találmányi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: dr. Szvoboda Gabriella osztályvezető
ARCANUM Bt. – BUDAPEST