

(19) DANMARK



(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT

(11) 163932 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 1112/83

(51) Int.Cl.5

C 07 K 15/26

(22) Indleveringsdag: 07 mar 1983

C 12 N 15/20

(41) Alm. tilgængelig: 28 okt 1983

C 12 N 15/62

(44) Fremlagt: 21 apr 1992

C 12 N 15/81

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 08 mar 1982 US 355297 01 nov 1982 US 438236

(71) Ansøger: *GENENTECH, INC.; 460 Point San Bruno Boulevard; South San Francisco; California 94080, US

(72) Opfinder: Ronald Arthur *Hitzeman; US, David Wai-Hung *Leung; US

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

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af et pattedyrprotein, som er heterologt for en gærorganisme, som produkt af gærudtrykkelse -forarbejdning og -sekretion samt gærorganisme-cellekultur, dyrkningsmedium af cellekulturen og gærudtrykkelsesmedium

(56) Fremdragne publikationer

Andre publikationer: Proc. Natl. Acad. Sci. USA bind 78 (1981) side 4466-4470

(57) Sammendrag:

1112-83

En gærorganisme ændres genetisk via rekombinant-DNA-teknologi, således at den dirigeres til at udtrykke, forarbejde og secernere et polypeptid, som almindeligvis er heterologt for værtsorganismen.

DN 103932 B

Denne opfindelse angår alment rekombinant-DNA-teknologi under udnyttelse af gærværtssystemer og udtrykkelsesmedier, der udtrykker, forarbejder og secernerer heterologt protein som særskilt produkt uden ledsagelse af uønsket præsekvens eller andet kunstigt udtrykkelsesprodukt.

Den erkendelse, hvorpå denne opfindelse er baseret, er det første tilfælde, hvor et protein, som normalt er heterologt for en gærvært, kan udvindes i nyttige mængder fra mediet, der opretholder gærkulturen, efter at det er blevet udtrykt, forarbejdet og secerneret af gærorganismen på en måde, som efterligner dets produktion i nativt cellemiljø. Således er denne opfindelse resultatet af den heldige manipulation af udtrykkelsesmedier og gærvært til at dirigere syntesen af protein, som ikke normalt syntetiseres af gærværten, og især til at regulere gærværten således, at proteinet kommer under direction af dens sekretoriske vej.

I overensstemmelse hermed angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af nyttige mængder af et pattedyrprotein ud fra dyrkningsmediet af en gærkultur af levedygtige celler, der indeholder udtrykkelsesmedier indeholdende DNA, som koder for proteinet. Af stor fordel er det, at det ved denne opfindelse er muligt at opnå et nyttigt, særskilt proteinprodukt i cellekulturmediet, så man ikke behøver at gribe til cellelyse for at udvinde det produkt, som hidtil kun har været tilgængeligt fra celleindholdet, ofte i en anden form end den modne.

De publikationer og andre skriftlige materialer, som der henvises til i denne beskrivelse for at belyse opfindelsens baggrund og i særlige tilfælde for at give yderligere detaljer med hensyn til dens udøvelse, er af

nemheds grunde samlet i den vedføjede bibliografi, til hvis numre der henvises i det følgende.

Opfindelsens baggrund

Gærorganismer transporterer naturligt et lille antal af visse homologe proteiner hen til og somme tider igennem plasmamembranen som en vigtig hjælp til celleoverfladens vækst og cellemetabolismen. Når cellen danner knop som et led i formeringen forud for dannelsen af en dattercelle, kræves yderligere proteiner til dannelsen af cellevæg og plasmamembran såvel som til metabolismen. Nogle af disse proteiner må finde deres vej til funktionsstedet; derfor antages der at eksistere en sekretorisk vej (1). Visse homologe proteiner, som er involveret i de ovennævnte processer, dannes ved translation i det endoplasmatiske reticulum. Homologe proteiner er dem, der normalt produceres af gærarten og kræves for dens levedygtighed. Når de først er dannet, vandrer de ved enzymatisk overførsel til Golgi-apparatet og derfra inden i vesicler til plasmamembraner, hvor nogle forbindes med eller i nogen grad trænger ind i rummet mellem plasmamembranen og cellevæggen. Et lille antal homologe proteiner synes at eksporteres fuldstændigt igennem cellevæggen, såkaldt α -faktor- og dræber-toxin (2, 3).

Igen synes cellens knopområde at være stedet for tiltrækning af vesiclerne, og ved deres sammensmeltning med knoppens indre overflade medvirker de til plasmamembranens og antageligvis cellevæggens samlede vækst (4, 5, 6). Denne teori giver intet bevis for, at der faktisk sker sekretion eller vandring af proteinet eller proteinerne igennem membranen. Ligeledes er det stadig kontroversielt om glycosylering af proteinet eventuelt hjælper med til eller er impliceret i den såkaldte sekre-

toriske proces. Endvidere antages "secernerede" proteiner pr. definition at have et signal-præpeptid, som postuleres at være forbundet med transport- eller inkorporeringsprocessen ved membranoverfladen. Den eventuelle funktion af sådanne modifikationer af det modne protein i den sekretoriske proces og den samlede rolle af den sekretoriske vej ved overfladevæksten er spekulationer, som ikke er begrundet i fast bevis.

Roggenkamp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 78 (1981), side 4466 - 4470, beskriver transformation af en gærcelle med DNA, som koder for en bakteriel β -lactamase, og udtrykkelsen og forarbejdningen af β -lactamasen i gær. Imidlertid angives ikke noget om sekretion fra gær, og derfor blev det bakterielle protein ikke udvundet fra det medium, hvori gæren var dyrket. Der var ikke inden for den kendte teknik nogen forventning om, at hvis en gærvært blev transformet med DNA, som koder for et pattedyrprotein, der er heterologt for gærorganismen, ville pattedyrproteinet blive secerneret til mediet, således at det direkte kunne udvindes fra mediet. Af Roggenkamp et al.'s artikel kunne kun udledes, at det ville være nødvendigt at lysere værtsgærcellen og udvinde det udtrykte protein fra cellelysatsat.

Opfinderne i denne sag forestillede sig, at rekombinant-DNA-teknologi kunne yde værdifuld hjælp til besvarelse af de åbne spørgsmål om den sekretoriske proces i gærorganismer og dermed til at gøre det muligt for sådanne organismer at producere rigelige mængder af heterologe polypeptidprodukter endogent (se f.eks. 7-17) ved opnåelse af passende manipulation af gærværten til at dirigere sekretionen af heterologt protein i særskilt, moden form.

Sammenfatning af opfindelsen

Opfindelsen er baseret på den erkendelse, at gærorganismer kan bringes til at udtrykke, forarbejde og secerere protein, som normalt er heterologt for gærorganismen og ikke nødvendigt for dens levedygtighed, således at proteinet kan opnås ud fra det medium, der understøtter de levedygtige producerende gærceller, i særskilt form uden ledsagelse af uønsket polypeptid-præsekvens eller andet kunstigt udtrykkelsesprodukt. Egnede gærceller i en levedygtig kultur transformeres med udtrykkelsesmedier, som indeholder DNA, der koder for et heterologt protein og et heterologt signalpolypeptid. Efter udtrykkelse af proteinet sammen med det heterologe signalpolypeptid forarbejdes udtrykkelsesproduktet, og det modne heterologe protein eksporteres til mediet for cellekulturen. Produktet udvindes relativt let fra mediet uden behov for at nedbryde de levedygtige gærceller og fås i i øvrigt nativ form til anvendelse uden behov for at fjerne uønsket præsekvens eller andre kunstige udtrykkelsesprodukter (f.eks. det methionin, som er knyttet til den ellers første N-terminale aminosyre, og som er en konsekvens af udtrykkelsen af AUG-translations-startsignal-codonen). Således kan mediet opnås i en form, der er i det væsentlige fri for levedygtige eller nedbrudte (dvs. lyserede eller på anden måde brudte) celler og kan, fordi det indeholder det ønskede produkt, underkastes lettere anvendelig rensningsteknik. Et sådant produkt er efter rensning klart til brug efter sit formål. F.eks. finder humant leukocyt-interferon-produkt anvendelse som humant antiviralt og/eller anti-tumor-middel (se alment 7-17).

Sammenfattende omfatter den foreliggende opfindelse en fremgangsmåde til fremstilling af et pattedyrprotein, som er heterologt for en gærorganisme og ikke er nødvendigt

for dens levedygtighed. I særskilt form uden ledsagelse af polypeptid-præsekvens eller andet kunstigt udtrykkelsesprodukt, som produkt af gærudtrykkelse, -forarbejdning og -sekretion, og det særegne ved fremgangsmåden er angivet i krav 1's kendetegnende del. Endvidere tilvejebringer opfindelsen en gærorganisme-cellekultur, som er i stand til at producere et sådant protein, og som er særegen ved det, der er angivet i krav 8's kendetegnende del, et dyrkningsmedium af en sådan gærorganisme-cellekultur, for hvilket det særegne er angivet i krav 12's kendetegnende del, og et gærudtrykkelsesmedium, for hvilket det særegne er angivet i krav 13's kendetegnende del.

Ved betegnelsen "heterologt protein" skal forstås protein, som ikke normalt produceres af eller er nødvendigt for levedygtigheden af en gærorganisme. Denne betegnelse omfatter den funktionelle indsætning af DNA, der koder for et sådant protein, via rekombinant-DNA-teknologi i et udtrykkelsesmedium, der igen anvendes til at transformere en gærorganisme-vært. Funktionel indsætning af DNA betyder indsætningen af DNA, som koder for det heterologe protein og præsekvensen, i en udtrykkelsesvektor under kontrol af udtrykkelsesdirigerende promotor-systemer. Eksempler på sådant heterologt protein er hormoner, f.eks. humant væksthormon, okse-væksthormon osv., lymphokiner, enzymer, interferoner, f.eks. humane fibroblast-, humane immun- og humane og hybride leukocyt-interferoner osv., virale antigener eller immunogener, f.eks. mund- og klovssyge-antigener, influenza-antigenisk protein, hepatitis-kerne- og -overfladeantigener osv., og forskellige andre polypeptider, f.eks. humant serumalbumin, humant insulin, forskellige glycoproteiner osv. "Heterolog præsekvens" eller "heterologt signal-polypeptid" henfører til sådanne polypeptider, der ikke normalt produceres eller anvendes af et gær-system, og kan udvælges

blandt det signal-polypeptid, som er nativt for det pågældende heterologe protein, eller andet heterologt (signal) polypeptid, som er funktionelt forbundet med det pågældende heterologe protein.

5 "Sekretion" betyder i denne beskrivelse eksport af produkt igennem plasmamembranen og mindst ind i eller igennem gærorganismens cellevæg til det medium, som understøtter cellekulturen. I denne forbindelse vil det forstås, at "secerneret" produkt i nogle tilfælde forbindes på en eller anden måde med cellevæggen, hvilket
10 måske nødvendiggør en anden rensningsprocedure eller en modifikation af gærværtens struktur og funktion. "Forarbejdning" betyder den cellulære spaltning af signalpolypeptidet fra det modne protein til dannelse af proteinet uden ledsagelse af fremmed peptid i såkaldt særskilt,
15 moden form. Ved fremmed peptid skal også forstås kunstige peptidudtrykkelsesprodukter, såsom methionin, som anført ovenfor. Forarbejdning tillader inkonsekvent spaltning af signalpolypeptidet ved et locus, som ikke er inaktiverende nær ved det præcise punkt for signalpolypeptidets forening med modent protein.
20

25

30

35

Kort beskrivelse af tegningerne

- Fig. 1 viser en sammenligning af aminosyresekvensen af signal-præpeptidet af humant IFN- α 1 (præ-D), IFN- α 2 (præ-A), IFN- α 1,2 (præ-D/A), IFN- γ (præ- γ) og IFN- β (præ- β). De understregede aminosyrer repræsenterer forskelle mellem aminosyresekvenserne af præ-A og præ-D. DdeI-stedet indicerer forbindelsen mellem D- og A-præsekvenserne ved fremstilling af den hybride præ-D/A-sekvens.
- 10 Fig. 2 er et diagram over gærudtrykkelsesplasmidet YEplPT, der anvendes her som et alment medium for udtrykkelse af forskellige genindsætninger, og viser nogle af dets restriktionssteder og forskellige områder af interesse.
- 15 Fig. 3 viser konstruktionen af et EcoRI-fragment indeholdende præ-plus-IFN- α 1-genet til direkte udtrykkelse af IFN- α 1 i gær.
- Fig. 4 viser konstruktionen af et EcoRI-fragment indeholdende det modne IFN- α 2-gen til direkte udtrykkelse i gær.
- 20 Fig. 5 viser konstruktionen af EcoRI-fragment indeholdende præ-plus-IFN- α 2-genet med kodningssekvensen for de første 14 aminosyrer i præsekvensen af præ-IFN- α 1 til direkte udtrykkelse af IFN- α 2 i gær.
- 25 Fig. 6 viser konstruktionen af et EcoRI-fragment indeholdende præ-plus-IFN- γ -genet med 70 bp af ledersekvensen forud for start-ATG-codonen til udtrykkelse af IFN- γ i gær.

Fig. 7 viser konstruktionen af et EcoRI-fragment indeholdende præ-plus-IFN- γ -genet til direkte udtrykkelse af IFN- γ i gær.

5 Fig. 8 giver en sammenfatning af alle de konstruktioner, som er anvendt til udøvelse af den foreliggende opfindelse ved udtrykkelsen, forarbejdningen, og sekretionen af de forskellige IFN-gener i gær.

10 Fig. 9 er en vækstkurve af a) YEplPT-LeIFA1/pep4-3 og b) YEplPT-preLeIFA53t/pep4-3 målt som absorbansen ved 660 nm (A_{660}). Medier blev prøvet for interferonaktivitet for a) og for b) under anvendelse af en bioprøvnings. Tiden henfører til timers vækst ved 30 °C.

15 Fig. 10a er en vækstkurve for en 5 liters gæring af YEplPT-preLeIFA53t/pep4-3. (●) er absorbansen ved 660 nm (A_{660}), og (o) millioner enheder af interferonaktivitet pr. liter inden i cellerne.

Fig. 10b er den samme vækstkurve som defineret i fig. 10a, der angiver aktiviteten fra mediet.

20 Fig. 11 er en elueringsprofil af medie-præ-D/A-LeIF fra en monoklonal antistofsøjle.

Fig. 12 er HPLC-sporingen af den maksimale A-interferon-sammenhældning fra den monoklonale antistofsøjle.

Fig. 13 er resultatet af aminosyre-sekvensbestemmelse på produktet opnået efter HPLC-rensning.

25 Fig. 14 viser de forskellige konstruktioner anvendt til at fremstille humant væksthormon (HGH) ifølge opfindelsen.

Fig. 15 viser skematisk restriktionskortet af 3,1 kbp HindIII-indsætningen i vektor pBl, hvorfra PGK-promotoren blev isoleret. Vist er indsætningen af et EcoRI-sted og et XbaI-sted i den 5'-flankerende DNA af PGK-genet.

Fig. 16 viser den 5'-flankerende sekvens plus den begyndende kodningssekvens for PGK-genet før indsætning af et XbaI-sted og et EcoRI-sted.

Fig. 17 viser skematisk den teknik, som er anvendt til at indsætte et XbaI-sted ved position -8 i PGK-promotoren og at isolere et 39bp fragment af den 5'-flankerende sekvens af PGK indeholdende denne XbaI-ende og en Sau3A-ende.

Fig. 18 viser skematisk konstruktionen af et 300 bp fragment indeholdende det ovennævnte 39 bp fragment, yderligere 5'-flankerende PGK-sekvens (265 bp) fra PvuI til Sau3A (se fig. 15) og et EcoRI-sted op til XbaI-stedet.

Fig. 19 viser skematisk konstruktionen af 1500 bp PGK-promotor-fragmentet (HindIII/EcoRI), som foruden det i fig. 4 konstruerede fragment indeholder et 1300 bp HindIII til PvuI-fragment fra den 5'-flankerende PGK-sekvens (se fig. 15).

Materialer

Alle DNA-restriktions- og metaboliske enzymer blev købt fra New England Biolabs og fra Bethesda Research Laboratories. DNA-restriktionsenzymer og metaboliske enzymer blev anvendt under betingelser og i puffer som beskrevet af deres respektive producenter. ATP og deoxynucleotidtriphosfaterne dATP, dGTP, dCTP og dTTP blev købt fra PL Biochemicals. DNA-linkere blev fremstillet ved standardmetoder.

DNA-fremstilling og transformation

Rensning af kovalent lukkede cirkulære plasmid-DNA'er fra *E. coli* (18) og transformation af *E. coli* (19) blev udført i overensstemmelse med tidligere beskrevne procedurer. *E. coli* miniscreens var som beskrevet i (20). Transformation af gær blev udført som tidligere beskrevet (21), men med de følgende modifikationer. 200 ml celler blev anvendt i en koncentration på 2×10^7 celler/ml og vasket med 25 ml vand ved centrifugering. Disse celler blev behandlet med 10 ml 1M sorbitol, 25 mM EDTA (pH = 8) og 50 mM dithiothreitol i 10 minutter ved 30 °C efterfulgt af en vaskning med 10 ml 1M sorbitol. Pelleteredede celler blev derpå forsigtigt gensuspenderet i 10 ml SCE (1M sorbitol, 0,1M natriumcitrat, pH = 5,8, og 0,01M EDTA) og behandlet ved 30 °C med 200 µg zymolase 60 000 (Kirin Brewery). Sfæroplast-dannelse blev fulgt til 80% ved tilsætning af 100 µl af suspensionen til 0,9 ml 10% SDS og måling af absorbansen ved 800 nm under anvendelse af en fortynding af celler før tilsætning af enzymet som 0 % (lyse i de 10 % SDS resulterer i et fald i A_{800}). Cellerne blev derpå vasket tre gange med 10 ml 1M sorbitol. Celler kan opbevares flere dage ved 0 °C i sorbitolet. Cellerne blev derpå vasket en gang med 1M sorbitol, 10 mM CaCl_2 og 10 mM "Tris"-HCl (pH 7,4) og derpå gensuspenderet i 1 ml af det samme. 5-15 µg rensset plasmid-DNA eller 20 µl miniscreen-DNA fra *E. coli* (2/5 af plasmid-DNA'en fra en 5 ml stationær kultur af *E. coli* dyrket i LB) tilsattes derpå og blev forsigtigt blandet med 100 ml af de gensuspenderede celler i 15 minutter. Derpå tilsattes 1 ml af en opløsning indeholdende 20 % (vægt/vol.) polyethylenglycol 4000 (Baker), 10 mM CaCl_2 og 10 mM "Tris"-HCl (pH 7,5) under forsigtig blanding i 15 minutter. Cellerne blev derpå centrifugeret ned og forsigtigt gensuspenderet i 200 µl SOS (1M sorbitol,

33,5 vol.% YEPD-væske og 6,5 mM CaCl_2) og inkuberet ved 30 °C i 20 minutter. 100 μl af denne suspension blev derefter anbragt på en Petri-plade indeholdende 20 ml bundagar (182 g sorbitol, 20 g glucose, 6,7 g YNB og 30 g Difco-agar pr. liter vand), som blev dækket med 10 ml 50 °C topagar (samme som bundagar, men med 1 ml adenin (1,2 mg/ml), 1 ml uracil (2,4 mg/ml) og 1 ml -trp "drop-out"-blanding pr. 50 ml bundagar [-trp "drop-out"-blanding indeholder disse aminosyrer pr. 100 ml vand: 0,2 g arg, 0,1 g his, 0,6 g ile, 0,6 g leu, 0,4 g lys, 0,1 g met, 0,6 g phe, 0,5 g thr]). Denne Trp^+ -selektion resulterer i 10^3 - 10^4 gærtransformanter pr. μg plasmid-DNA.

Gærplasmid blev opnået fra gær ved dyrkning af 15 ml gær til stationær fase ($A_{660} = 5-6$) i YNB+CAA (se "Stammer og Medier" nedenfor) ved sfæroplast-dannelse som ved den ovenstående procedure, ved pelletering af celler og ved anvendelse af E. coli miniscreen-proceduren (uden lysozym) som beskrevet i (20).

Stabiliteten af plasmider i gær blev bestemt ved fortynding af celler under selektiv vækst i YNB+CAA og udpladning på YEPB-plader (ikke selektive). Efter 2 dages vækst ved 30 °C blev disse plader replica-udpladet på YNB+CAA-plader (Trp^+ -selektion). Procent plasmid-stabilitet blev udregnet ved antallet af kolonier, som vokser ikke-selektivt minus dem, der ikke vokser selektivt, divideret med antallet af kolonier dyrket ikke-selektivt gange 100.

Stammer og medier

E. coli K-12 stamme 294 (ATCC nr. 31446) (22) blev anvendt til al anden bakterietransformation. Gærstammerne pep4-3 (20B-12, d trp1 pep4-3) (23) og GM3C-2- (α , leu

2-3, leu 2-112, trp 1-1, his 4-519, cyc 1-1, cyp 3-1)
 (24) blev anvendt til gærtransformationer. Gærstammerne
 20B-12 og GM3C-2 er blevet deponeret uden begrænsning
 i the American Type Culture Collection under ATCC nr.
 5 20 626 og 20 625, begge den 5. marts 1982. Forskellige
 gærstammer kan anvendes; se Lodder et al., The Yeasts,
 a Taxonomic Study, North-Holland Publ. Co., Amsterdam.
 På lignende måde kan der anvendes forskellige medier
 Difco Manual of Dehydrated Culture Media and Reagents
 10 for Microbiological and Clinical Laboratory Procedures,
 9th Ed., Difco Laboratories, Inc., Detroit, Michigan,
 U.S.A. (1953).

LB var som beskrevet af Miller (25) med tilsætning af
 20 μ g/ml ampicillin (Sigma) efter at mediet er autokla-
 15 veret og afkølet. Gær blev dyrket på de følgende medier:
 YEPD indeholdt 1 % gærekstrakt, 2 % pepton, 2 % glucose
 og omkring 3 % Difco-agar. YNB+CAA indeholdt 6,7 g gær-
 nitrogenbase (uden aminosyrer) (YNB, Difco), 10 mg
 adenin, 10 mg uracil, 5 g Difco-casaminsyrer (CAA),
 20 20 g glucose og omkring 30 g agar pr. liter (anvendt til
 Trp⁺-selektion).

Vækstkurve og ekstraktfremstilling

Individuelle kolonier af gærstammerne YEplPT-preLeIF-A
 53t/pep4-3 og YEplPT-LeIF-A 1/pep4-3 blev dyrket i 7 timer
 25 ved 30 °C i 100 ml YNB+CAA til en A_{660} på omkring 1,1.
 100 ml af disse kulturer blev fortyndet til 1 liter med
 YNB+CAA til opnåelse af en opløsning med $A_{660} = 0,1$. Dis-
 se en-liter kulturer blev derpå dyrket ved 30 °C, og der
 blev med mellemrum udtaget 10 ml aliquoter til måling af
 30 optisk tæthed, interferonproduktion og sekretion. Til
 prøvning blev hver 10 ml aliquot centrifugeret ved 7 000
 omdr./min i 15 minutter i en "Sorval RC3B". Supernatanten
 (mediet) blev prøvet uden fortynding. Cellerne blev gen-

suspenderet i 0,4 ml 7M guanidin-HCl indeholdende et
 lige så stort volumen glasperler og blev centrifugeret
 to gange i 2 minutter ved høj hastighed. Cellelysate
 blev derpå fortyndet i PBS/BSA (150 mM NaCl, 20 mM
 5 natriumphosphat (pH = 7,9) og 0,5 % okseserumalbumin)
 til bioprøvning.

Interferonprøvninger

Ekstrakter af gær blev prøvet for interferon ved sam-
 menligning med interferon-standarder ved prøvningen
 10 for inhibering af den cytopathiske effekt (CPE) (26).
 Gærekstrakter blev fremstillet som følger: 10 ml kul-
 turer blev dyrket i YNB+CAA, indtil de nåede en A_{660}
 på fra omkring 1 til omkring 2. Cellerne blev opsamlet
 ved centrifugering og derpå gensuspenderet i 3 ml 1,2M
 15 sorbitol, 10 mM KH_2PO_4 , pH = 6,8 og 1 % zymolyase 60 000
 og derefter inkuberet ved 30 °C i 30 minutter (til 90 %
 sfæroplastdannelse). Sfæroplasterne blev pelleteret ved
 3000 x g_n i 10 minutter og derpå gensuspenderet i 150 μ l
 7 M guanidin-hydrochlorid (G·HCl) plus 1 mM phenylmethyl-
 20 sulfonylfluorid (PMSF). Ekstrakter blev fortyndet 20 -
 100 gange i PBS/BSA-puffer (20 mM NaH_2PO_4 , pH = 7,4,
 150 mM NaCl, 0,5 % BSA) umiddelbart før prøvningen. Al-
 ternativt blev 10 ml celler ved den samme A_{660} pelleteret
 og gensuspenderet i 0,4 ml 7 M G·HCl i et Eppendorf-glas
 25 (1,5 ml) indeholdende omkring 0,4 ml glasperler (0,45-
 0,5 mm, B. Braun Melsungen AG). Disse glas blev centrifuge-
 ret to gange i 2 minutter ved højeste hastighed, idet de
 holdtes på is imellem. Ekstrakterne blev centrifugeret
 0,5 minutter i Eppendorf-centrifuge og fortyndet i PBS/BSA-
 30 puffer som ovenfor. Bioprøvninger blev gennemført med
 MDBK-celler (26) for LeIF A, LeIF D og præ-formerne; men
 med HeLa-celler (26) for IFN- γ og præIFN- γ .

Rensning af (præ-D/A) LeIF A fra mediet

En enkelt koloni af gærstammen YEplPT-præLeIF-A
53t/pep4-3 blev dyrket ved 30 °C i 500 ml YNB+CAA
til en A_{660} på 2,4. 500 ml af denne kultur blev for-
tyndet til 5 liter med YNB+CAA til opnåelse af en
5 A_{660} på 0,21; den resulterende 5 liters kultur blev
dyrket ved 30 °C, indtil A_{660} var 4. På dette tids-
punkt blev 5 liters kulturen høstet ved centrifuge-
ring ved 7 000 omdr./min. i 10 minutter. 10 ml aliquoter
10 blev udtaget med mellemrum under gæringen for at måle
optisk tæthed, interferonproduktion og sekretion. Før
prøvningen blev hver aliquot centrifugeret i 5 minut-
ter i en lille laboratoriecentrifuge med afkøling for
at adskille cellerne fra mediet. Mediet og cellerne
15 blev prøvet som beskrevet ovenfor (se Fig. 9, 10a, 10b).

Mediet blev koncentreret til et slutvolumen på 200 ml
og derpå diafiltreret over for tris/cys/EDTA, pH 8,0
på en 1000 dalton ultrafiltreringsmembran (O-PS,
Osmonics) i et Amicon tyndkanalsapparat (TCF 10). Re-
tentatet (200 ml) sendtes over en 1,5 ml immunoaffinitet-
20 søjle indeholdende et monoklonalt antistof for LeIF-A
kovalent bundet til "Affigel 10" (BioRad) ved en strøm-
ningshastighed på 15 ml/time. Mere end 80 % af inter-
feronaktiviteten i den oprindelige opløsning blev bun-
det til søjlen. Gennemstrømningen blev derpå genoptaget
25 med en strømningshastighed på 40 ml/time. Efter den an-
den påføring fandtes omkring 7 % af den oprindelige in-
terferonaktivitet i gennemstrømningen. Søjlen blev derpå
vasket med 0,2M NaCl i tris/cys/EDTA, pH 8,0. Omkring
30 1,7 % af aktiviteten blev elueret under denne vaskning.

Hovedparten af interferonaktiviteten (omkring 50 % af
den oprindelige aktivitet) blev derpå elueret fra søjlen
med 51,5 ml deioniseret vand med pH 5,5. Søjlen blev en-

delig vasket med 22,5 ml 0,2 M eddikesyre for at eluere alt resterende protein; ca. 8 % af den oprindelige aktivitet blev elueret. Efter eddikesyreeluering blev søjlen genækvilibreret med tris/cys/EDTA, pH 8,0.

5 Fraktioner på 2,25 - 4,5 ml blev opsamlet under vaskningerne med vand, eddikesyre og tris/cys/EDTA (Fig. 11). Fraktionerne nr. 1-7 blev hældt sammen og lyophiliseret til tørhed. Remanensen blev genopløst i 200 μ l 0,1 % trifluoreddikesyre (TFA), pH 2,5 og yderligere renset

10 ved HPLC på en Synchropak RP-P søjle. Søjlen blev elueret med en strømningshastighed på 1 ml/minut med en lineær gradient på 0 - 100 % acetonitril i 0,1 % TFA, pH 2,5. Der blev opsamlet 1 ml fraktioner, som blev prøvet efter fortynding i PBS/BSA som beskrevet ovenfor.

15 En 2,5 μ g prøve af renset IFN-A blev også chromatograferet som kontrol (Fig. 12). Interferonaktiviteten blev elueret fra søjlen som et enkelt maksimum centreret omkring fraktion 39. Denne fraktion blev lyophiliseret til tørhed, og remanensen sekvensbestemt.

20 Sekvensanalyse

Sekvensanalyse blev baseret på Edman-nedbrydningen (27). Prøven blev indført i bageret på en Beckman 890B "spinning cup"-sekvensanalysator. "Polybrene" poly-

(N,N,N¹N¹-tetramethyl-N-trimethylenhexamethyldiam-

25 moniumdiacetat) blev anvendt som bærer i bageret (28). Sekvensanalysatoren blev modificeret med en kold fælde og nogle programændringer for at reducere baggrundsmaksima. Reagenserne var Beckman's sekvensbestemmelseskvalitet 0,1 molær "Quadrol"-puffer, phenylisothiocyanat og

30 heptafluorsmørsyre.

En modifikation inkluderede også automatisk omdannelse af 2-anilino-5-thiazolinon-derivaterne, efterhånden som de blev ekstraheret fra sekvensanalysatoren. 1-chlorbu-

tanet blev opsamlet i en "Pierce Reacti-VialTM" og tørret under nitrogen. Derpå sættes 25 % trifluor-eddikesyre (TFA) i vand til 2-anilino-5-thiazolinonet, og blandingen blev opvarmet til 20 °C i 10 minutter for at omdanne det til 3-phenyl-2-thiohydantoin (PTH-derivat) (29). PTH-aminosyreresten blev derpå automatisk opløst i 50 % acetonitril og vand og injiceret i en revers-fase højtryksvæskechromatograf. Hver PTH-aminosyre blev derpå identificeret ved sammenligning med tilbageholdelsestiderne for en standardblanding af PTH-aminosyrer, som blev indført i omdannelsesampullen og behandlet på samme måde som en cyklus fra sekvens-analysatoren. Resultaterne er sammenfattet i fig. 13 og omtalt nedenfor.

15 Western-dupningsproceduren

Proteiner blev først underkastet elektrophorese på en polyacrylamid-pladegæl i nærvær af natriumdodecylsulfat (46, 47) før elektroforetisk overførsel til nitrocellulosepapir (S + S BA 85) og efterfølgende immunologisk identifikation af HGH. Overførselsapparatet (Electroblot, E.C. Apparatus Corp., St. Petersburg, FL.) blev samlet, efter at gelen og nitrocellulosepapiret var blevet vasket kort med en overførselspuffer indeholdende 25 mM "Tris", 192 mM glycin, pH 8,4. Overførslen blev udført ved 400 mA i 1,5 timer, hvorefter afdupningen blev anbragt i 50 mM "Tris" pH 7,4, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 0,25 % gelatine (vægt/vol), 0,05 % NP-40 og omrørt forsigtigt natten over. En passende fortynding af kanin-anti-HGH-antiserum blev anbragt i en plasticpose med afdupningen og NP-40/gelatine-puffer (typisk 100 μ l/cm²) og inkuberet i 2 timer ved stuetemperatur under forsigtig rokning. Afdupningen blev vasket kort med vand efterfulgt af NP-40/gelatine i 1 time og sonderet med [¹²⁵I] Protein A (New England Nuclear) fortyndet i

NP-40/gelatine-puffer i en "Seal-a-Meal"-pose i 1 time ved stuetemperatur under forsigtig røkning. Efter vaskning flere gange med vand blev dupningen svøbt ind i cellofan og anbragt i en kassette natten over med
 5 "X-Omat-AR" film (Kodak) med en intensiveringsskærm ved -70°C .

Gelfarvning

Polyacrylamidgeler indeholdende protein blev farvet ved den metode, der er beskrevet af Oakley et al (41).

10 Sekretionssignalsekvenser af pattedyrinterferongener

Med den nylige isolering af cDNA'er indeholdende generne for leukocyt- (7), fibroblast- (10) og immun- (30) interferoner og den nylige udvikling af gær som et udtrykkelsessystem for heterologe gener (14) blev det
 15 muligt at prøve udtrykkelsen af heterologe gener indeholdende kodningsområder for signalpeptidsekvenser i gær.

Fig. 1 viser signalsekvenserne for fem forskellige interferoner. Disse aminoterminal sekvenser antages at lette sekretionen af interferonproteiner fra pattedyr-
 20 celler. Under processen fjernes signalsekvensen ved specifik proteasespaltning mellem position -1 og +1 til dannelse af hvad der kendes som den modne form af interferonet. Disse sekvenser har almene karakteristika fra andre sekretionssignalsekvenser (31). De er alle meget
 25 hydrofobe, af omkring samme længde som andre signaler og har en lille aminosyre til venstre for spaltningsstedet. Selv om præLeIFA, præLeIFD og præIFN- γ alle spalter mellem glycin og cystein, er dette ikke en almindelig regel for andre pattedyrsignaler som vist ved præIFN- β .

Faktisk er der ingen overensstemmelsessignalsekvens blandt organismer eller inden for den samme organisme. Der er heller ingen overensstemmelsessekvens ved spaltningsspunktet mellem signalsekvensen og den modne
5 form af proteinproduktet.

Derfor var det af stor interesse at forsøge udtrykkelsen af disse præ-interferoner i gær for at bestemme, om disse heterologe proteiner ville secerneret fra gær, og af hvad art bearbejdningen af disse proteiner kunne
10 være. Selv om gær er en eukaryotisk organisme ligesom pattedyrceller, og selv om gær viser sig at have en sekretionsvej, der i mange henseender er mægtig til højere eukaryoters (1, 32), er det en meget primitiv eukaryot, og den rette funktion og bearbejdning af disse genpro-
15 dukter ville kræve en stor bevarelse af processen mellem gær og pattedyrceller under udviklingen, hvorefter resultaterne ikke altid er indlysende.

Konstruktion af et gærplasmid til udtrykkelse af præ-interferon-generne

20 Information vedrørende konstruktionen af et plasmid til udtrykkelse af et heterologt gen i gær er blevet publiceret (14).

Plasmidet, som anvendtes i dette arbejde, er vist i fig. 2. Dette plasmid indeholder en portion af pBR322 (33)
25 med ampicillin-resistens-(Ap^R)genet og E. coli repli- ceringsoriginet for selektion og stabil vækst i E. coli (anvendt som mellemprodukt mellem in vitro konstruktion og transformation af gær). Plasmidet indeholder også TRP1- genet på et EcoRI til PstI fragmentet, som stammer fra
30 chromosom III i gær (34-36). Dette gen muliggør selektion i trp1⁻ gær og kan således anvendes til at isolere gærceller indeholdende plasmidet og til opretholdelse af

5 plasmidet. Endvidere indeholder plasmidet et gær-repliceringsorigin på et 2,0 kbp fragment fra endogent gær-2 μ -plasmid-DNA (37). Dette origin tillader DNA'en at repliceres autonomt i gær og opretholdes som plasmid.

10 Den anden hovedkomponent i systemet er gær-3-phosphoglycerat-kinase (PGK)-promotorfragmentet, som originerer transcription nær ved det eneste EcoRI-sted i plasmidet (det andet EcoRI-sted blev fjernet ved udfyldning af det restriktionsspaltede sted under anvendelse af E. coli DNA-polymerase I (Klenow) efterfulgt af stump-ende-ligering).

15 Isoleringen af 3-phosphoglyceratkinase (PGK)-genet er blevet omtalt andetsteds (37a) såvel som konstruktionen af 1,6 kbp promotorfragmentet (nedenfor). Et Hind III/Bgl II fragment fra gær-TRP 1 genområdet (34-36) i chromosom III blev anvendt som omdanner af Hind III til Bgl II til ligering med BamHI-stedet i pBR322, hvilket gør plasmidet tetracyclinfølsomt (Tc^S). Endvi-
20 dere bør det nævnes, at 2,0 kbp fragmentet fra 2 μ DNA udøver en anden funktion ved, at det indeholder et transcriptionsafslutnings/polyadenylerings-signal, som normalt er afslutningssignalet for "Able"-genet i 2 μ plasmid (37). Et sådant område viser sig at være nødvendigt
25 for god udtrykkelse. Gen indsætninger som EcoRI-fragmenter i den rette orientering kan derpå udtrykkes som protein, når vektoren indføres i gær.

Konstruktion af gærplasmider til udtrykkelse af de
forskellige interferogener

30 Gærudtrykkelsesplasmidet YEplPT indeholder et enkelt EcoRI-restriktionssted. Indsætning af et fremmed gen i dette eneste EcoRI-sted fører til udtrykkelsen af

dette gen under kontrol af gær-phosphoglyceratkinase (PGK)-promotoren. En hensigtsmæssig måde at indsætte de forskellige interferogener i EcoRI-stedet af dette gærplasmid er at have DNA-fragmenter med
5 EcoRI-steder flankerende startcodonen og afslutningscodonen af de forskellige interferogener. Vi beskriver her konstruktionen af sådanne EcoRI-fragmenter til udtrykkelse af interferogener. Det er vigtigt at anvende omdannere til EcoRI ved genets 3'-ende,
10 således at de ikke afslutter transcription, men tillader transcription igennem 2 μ -terminatoren.

Vi har tidligere beskrevet konstruktionen af et EcoRI-sted lige før ATG-startcodonen for det modne IFN- α 1-gen (14, 17), det modne IFN- α 2-gen (7), det modne
15 IFN- β -gen (10) og det modne IFN- γ -gen (30).

DNA-restriktionsanalyse viser, at der er et EcoRI-sted hensigtsmæssigt lokaliseret i det ikke-kodende 3'-område af cDNA-klonen af IFN- α 1 (8), således at nedbrydning af plasmidet pLeIFD3 (17) med EcoRI skaber et
20 583 bp EcoRI-fragment, som indeholder hele IFN- α 1-genet.

Fig. 3 viser konstruktionen af et EcoRI-fragment indeholdende præ-IFN- α 1-genet. Et HaeIII-sted er lokaliseret mellem den første og den anden aminosyre af præ-IFN- α 1
25 (8). Et delvis HaeIII-nedbrudt 254 bp fragment, som strækker sig fra dette HaeIII-sted til BglIII-stedet i midten af kodningsområdet, blev isoleret. Et selvkomplementært syntetisk oligonucleotid, 5'-CCATGAATTCATGG-3', blev stump-ende-ligeret til 254 bp HaeIII-BglIII fragmentet for at skabe et EcoRI-sted forud for ATG-startcodonen. Et 264 bp EcoRI-BglIII fragment blev derpå isoleret ved nedbrydning af ligeringsblandingen med EcoRI
30 og BglIII. Dette EcoRI-BglIII fragment, som indeholder den

forreste halvdel af præ-IFN- α 1-genet, blev derpå liggeret til den bageste halvdel af præ-IFN- α 1-genet, et 372 bp BglII-EcoRI fragment isoleret fra nedbrydning af IFN- α 1-cDNA-klonen med BglII og EcoRI.

5 EcoRI-fragmentet indeholdende hele præ-IFN- α 1-genet blev derpå dannet ved nedbrydning af ligeringsblandingen med EcoRI og isolering af et 636 bp fragment.

Fig. 4 viser konstruktionen af et EcoRI-fragment indeholdende det modne IFN- α 2-gen. Et 876 bp EcoRI-PstI fragment, der indeholder det modne IFN- α 2-gen med et EcoRI-sted lige foran ATG-startcodonen og med 400 bp ikke-kodende 3'-område afledt fra cDNA-klonen blev isoleret ved nedbrydning af plasmidet pLeIFA25 (7) med

15 EcoRI og PstI. PstI-enden af dette 876 bp fragment blev derpå omdannet til et EcoRI-sted ved anvendelse af et adaptor-fragment. Dette 978 bp adaptor-fragment indeholder et indre EcoRI-sted og har PstI-steder ved begge

20 ender. 230 bp af dette fragment, som strækker sig fra den ene Pst-ende til EcoRI-stedet, afledes fra gærplasmid-2/u-DNA (37). 748 bp af resten af fragmentet, som strækker sig fra EcoRI-stedet til den anden PstI-ende, afledes fra bakterieplasmidet pBR322 (hele fragmentet afledes fra YEpl3 (37b)). Ligering af dette adaptor-

25 fragment til 876 bp EcoRI-PstI-fragmentet indeholdende det modne IFN- α 2-gen efterfulgt af nedbrydning med EcoRI skaber et 1096 bp fragment indeholdende det modne IFN- α 2-gen med EcoRI-steder ved begge ender.

Fig. 5 viser konstruktionen af et EcoRI-fragment indeholdende præ-IFN- α 2-genet. Restriktionsanalyse viser,

30 at der findes et fælles DdeI-sted mellem den 14. og den 15. aminosyre i præsekvensen af både præ-IFN- α 1- og - α 2-genet. Ligering af 44 bp EcoRI-DdeI fragmentet afledt fra EcoRI-fragmentet, der koder for præ-IFN- α 1-

genet, og 900 bp DdeI-PstI-fragmentet afledt fra cDNA-klonen af IFN- α 2 efterfulgt af nedbrydning med EcoRI og PstI skaber et 944 bp fragment. Dette 944 bp EcoRI-PstI-fragment indeholder kodningssekvensen af de første 14 aminosyrer i præpeptidet afledt fra IFN- α 1, kodningssekvensen af resten af præpeptidet og hele det modne protein afledt fra IFN- α 2. PstI-enden af dette 944 bp fragment blev derpå omdannet til et EcoRI-sted under anvendelse af adaptor-fragmentet som ved konstruktionen af et EcoRI-fragment for modent IFN- α 2.

Fig. 6 viser konstruktionen af et EcoRI-fragment indeholdende præ-IFN- γ -genet med 70 bp ledersekvens forud for ATG-startcodonen. Nedbrydning af IFN- γ -cDNA-klonen (30) skaber et 842 bp Sau3A-fragment med 60 bp 5'-flankerende sekvens, hele kodningssekvensen for præ-IFN- γ og 290 bp ikke-kodende 3'-sekvens. Dette Sau3A-fragment blev derpå klonet ind i en BamHI-nedbrudt vektor pUC7, et plasmid-modstykke til den enkeltstrengede fag M13mp⁷ (38). Plasmidet pUC7 blev afledt fra pBR322 ved først at fjerne 2067 bp EcoRI-PvuII-fragmentet indeholdende tetracyclinresistens-genet, derpå indsætte et 425 bp HaeII-fragment fra fag-M13-derivatet mp7 (38) ind i HaeII-stedet af det resulterende plasmid ved position 2352 (i forhold til pBR322-notationen). HaeII-fragmentet fra mp7 indeholder det N-terminale kodningsområde af E. coli lacZ-genet, hvori et multi-restriktionsenzym-kloningssted af sekvensen er blevet indsat mellem den 4. og 5. aminosyrerest af β -galactosidase. Indsætning af et fremmed DNA-fragment i disse kloningssteder afbryder kontinuiteten mellem lac-promotoren og lacZ-genet, hvilket ændrer fænotypen af en JM83 transformeret med plasmidet fra lac⁺ til lac⁻. Da der er to EcoRI-steder, som flankerer BamHI-stederne i multi-restriktions-kloningsstedet i pUC7, ville nedbrydning af plasmidet indeholdende 842 bp Sau3A-indsætningen med EcoRI give et

862 bp fragment indeholdende hele præ-IFN- γ -sekvensen flankeret af EcoRI-steder.

Nedbrydning af plasmidet pIFN- γ trp48 (30) med EcoRI og BglI skaber et 689 bp fragment med en EcoRI-
 5 ende foran ATG-startcodonen, hele kodningssekvensen af modent IFN- γ og 210 bp ikke-kodende sekvens. BglI-enden blev derpå omdannet til en EcoRI-ende ved ligering til en 29 bp BglI-EcoRI adaptor afledt fra det tidligere beskrevne præ-IFN- γ -EcoRI-fragment. Efterfølgende nedbrydning af ligeringsblandingen med EcoRI
 10 ville derpå danne et 718 bp EcoRI-fragment indeholdende det modne IFN- γ -gen.

Fig. 7 viser konstruktionen af et EcoRI-fragment indeholdende præ-IFN- γ -genet med en EcoRI-ende og sekvensen
 15 AAA foran ATG-startcodonen. Det tidligere beskrevne EcoRI-fragment indeholdende præ-IFN- γ -genet blev nedbrudt med EcoRI og MboII til dannelsen af et 184 bp fragment. Dette fragment, indeholdende den forreste del af præ-IFN- γ -genet, blev varmedenatureret og sammensmeltet (10) med et 5'-kinase-behandlet syntetisk oligonucleotid 5'-pATGAAATATACA, der koder for de første fire aminosyrer af præ-IFN- γ -genet. Med den nedre streng af
 20 EcoRI-MboII-fragmentet som skabelon og oligonucleotidet som primer blev Klenow-fragmentet af E. coli DNA-polymerase anvendt til at syntetisere den øvre streng og fjerne den 3'-udragende ende fra den nedre streng. Det resulterende 178 bp stump-endede fragment, som strækker sig fra ATG-startcodonen til det første MboII-sted nedenfor, blev derpå ligeret til en selvkomplementær
 25 5'-TTTGAATTCAAA-3' EcoRI-linker. Nedbrydning af ligeringsblandingen med EcoRI og DdeI skaber et 165 bp EcoRI-DdeI fragment, som indeholder den forreste del af præ-IFN- γ -genet. Hele genet blev derpå samlet ved ligering med 600 bp DdeI-EcoRI fragmentet, som indeholder den

bageste del af IFN- γ -genet og det ikke-kodende 3'-område. Ligeringsblandingen blev derpå nedbrudt med EcoRI til dannelsen af et 765 bp EcoRI-fragment indeholdende hele præ-IFN- γ -genet.

- 5 En sammenfatning af alle disse EcoRI-fragment-konstruktioner (I-IX) er vist i fig. 8. Alle disse konstruktioner blev anbragt i vektoren YEpIPT (fig. 2) til udtrykkelses- og sekretionsforsøg under anvendelse af gær.
- 10 Udtrykkelses- og sekretionsniveauer af interferoner med gær indeholdende disse plasmider

- Efter at EcoRI-fragment-generne fra fig. 8 var indsat i YEpIPT (fig. 2), undersøgt for orientering og indført i gær under anvendelse af Trp⁺-komplementering, blev
- 15 gæren indeholdende disse plasmider prøvet for interferon under anvendelse af prøvningen for cytopatisk effekt (CPE) (26) (bioprøvning) på ekstrakter, frigjort cellevægmateriale og medie. Interferonprøvninger blev udført på tre adskilte rumligt afgrænsede steder
- 20 i gærkulturen. Resultaterne af sådanne prøvninger er vist i tabel 1.

TABEL 1

Interferonudtrykkelssniveauer										
Gen- kon- struk- tion nr.	YEpl1 plasmid indeholdende disse EcoRI- fragmenter	Går	Inden i ^a celle U/1/A ₆₆₀ =1	pct. celle- protein	Frigjort efter fjernelse ^c af cellevæg (U/1/A ₆₆₀)	Pct. celle- protein	Uden for celle (medie) U/1/A ₆₆₀	Pct. celle protein	Ende- ligd A ₆₆₀	Pct. secer- neret akti- vit
I	LeIF D	GM3C-2	130x10 ⁶	1,0	0	0	0	0	1,0	0
II	præ LeIF D	GM3C-2	27x10 ⁶	0,3	0,4x10 ⁶	0,004	0,8x10 ⁶	0,008	1,4	4
III	LeIF A	pep4-3	130x10 ⁶	1,0	0	0	0	0	1,0	0
IV	(præ D/A) LeIF A	pep4-3	19x10 ⁶	0,2	0,5x10 ⁶	0,005	0,5x10 ⁶	0,005	1,0	6
IV	(præ D/A) LeIF A	pep4-3	25x10 ⁶	0,3	i.b.	---	2x10 ⁶	0,007	3-4	8
IV	(præ D/A) LeIF A	GM3C-2	28x10 ⁶	0,3	0,3x10 ⁶	0,003	0,5x10 ⁶	0,005	1,3	3
V	IFN-γ	pep4-3	0,6x10 ⁶	i.b.	i.b.	---	0	0	1,0	0
VI	præ IFN-γ + cDNA									
VI	5' flankerende sekvens	pep4-3	0,2x10 ⁶	i.b.	i.b.	---	0,03x10 ⁶	i.b.	1,2	15
VI	præ IFN-γ + cDNA									
VI	5' flankerende sekvens	GM3C-2	0,38x10 ⁶	i.b.	i.b.	---	0,06x10 ⁶	i.b.	0,93	16
VII	præ IFN-γ	pep4-3	0,9x10 ⁶	i.b.	i.b.	---	0,19x10 ⁶	i.b.	1,0	17
VII	præ IFN-γ	GM3C-2	1,9x10 ⁶	i.b.	i.b.	---	0,19x10 ⁶	i.b.	0,93	10

a) Se metoder til ekstrakt-fremstilling. Bemærk at der anvendes to metoder til fremstilling af ekstrakter. Når celler omdannes til sfæroplaster, er "inden i celle" mængden virkeligt indre materiale; men når der er anført "i.b." (ikke bestemt), er "inden i celle" mængden og "frigjort efter fjernelse af cellevæg" begge en del af "inden i celle" mængden - denne type ekstrakt involverer behandling af celler med glasperler uden fjernelse af cellevæg. Bemærk at glasperle-ekstraktion uden sfæroplastdannelse altid blev udført for IFN-γ og præIFN-γ, og at der anvendes PBS-puffer i stedet for 7M G.HCl.

b) De specifikke aktiviteter af LeIFA og LeIFD antages begge at være 10^8 U/mg protein for beregningerne. En gærkultur indeholder omkring 100 mg protein i kulturen ved en A₆₆₀ = 1.

c) Se proceduren under "Metoder til sfæroplastdannelse".

d) Den absorptionsprocent af kulturen, hvorved prøvningen udføres.

e) Sekretionsprocenten er procenten "frigjort efter fjernelse af cellevæg" plus procenten "uden for celle". Når der ikke udføres sfæroplastdannelse, inkluderer "procent seceret aktivitet" ikke denne cellevægsekretionsaktivitet, og procenten er lavere (måske 1/2) end den egentlig skulle være.

- Den første rumlige afgrænsning er inden i cellen. Denne fraktion måles ved fremstilling af en celleekstrakt, efter at cellevæggen er fjernet, og definerer interferonaktivitet, som ikke secernerer. De andre to
- 5 rumlige afgrænsninger er mediet (materiale fuldstændigt adskilt fra gærcellen) og den aktivitet, der frigøres fra cellerne efter cellevæg fjernelse under anvendelse af zymolyase (secerneret materiale, men indfanget ikke-kovalent i cellevæggen). Både mediefraktion
- 10 tionen og fraktionen frigjort efter fjernelse af cellevæg repræsenterer det totale secernerede materiale. Alternativt, hvis cellevæggene ikke blev fjernet (se "Metoder"), inkluderer "inden i celle" aktiviteten også den secernerede aktivitet fanget i cellevæggen.
- 15 Det bør bemærkes i tabel 1, at (præD/A)LeIFA er et modent LeIFA-gen med en hybrid signalpeptidsekvens (se fig. 1 og 8). Denne konstruktion er tidligere blevet omtalt; men det er indres, at den blev konstrueret ved anvendelse af DdeI-restriktionsstedet fælles for både
- 20 præLeIFD og præLeIFA. Fig. 1 viser dette DdeI-sted ved aminosyre -10. De understregede aminosyrer repræsenterer forskelle mellem aminosyresekvensen af præLeIFD og præLeIFA. Den hybride (præD/A)LeIFA ligner mere præD end præA.
- 25 Begge de modne LeIFA- og LeIFD-gener (konstruktionerne I og III) udtrykkes i gæren i niveauer på 1,0% af det totale celleprotein (niveauer på 2,0% er også set). De forkerte orienteringer af disse gener eller præ-generne udtrykkes ikke. For disse to gener såvel som det modne
- 30 IFN- α -gen sker der ingen sekretion. Hvis der imidlertid anvendes præsekvenser på disse gener, findes alle tre proteinprodukter i medierne som secernerede produkter. Niveauer så høje som 8% af den totale aktivitet er blevet iagttaget i mediet for (præD/A)LeIFA ved en $A_{660} =$

3 - 4. Det bør bemærkes, at alle disse plasmider er i 95 % af cellerne af en kultur, der vokser under TRP⁺-selektivt tryk, hvilket bekræfter tilstedeværelsen af et autonomt replicerende plasmid.

5 Vækstkurve og produktion i mediet fra en gær indeholdende (præD/A)LeIFA-genet

To interferonproducerende gærstammer blev undersøgt ved yderligere karakterisering. Disse var YEplPT-præ-LeIFA_{53t}/pep4-3 og YEplPT-LeIFA₁/pep4-3. Den først-

10 nævnte indeholder to kopier af konstruktion IV (fig. 8) i EcoRI-stedet af YEplPT og resulterer i aktivitet inden i cellen, i cellevæggen og uden for cellen (medie). Dette to-kopi-gen- (i fortsættelse af hinanden - begge i orientering til rigtig udtrykkelse) holdige

15 plasmid blev anvendt i stedet for enkelt-kopi-konstruktionen, da det sommetider gav højere niveauer af interferonaktivitet i mediet. Pep 4-3 gær blev anvendt, da den har stærkt reducerede intracellulære og ekstra-

20 cellulære proteaseniveauer (23), hvilket kan være en fordel med henblik på opnåelse af unedbrudt protein (interferon) fra mediet.

Den sidstnævnte indeholder konstruktion III (fig. 8) i YEplPT og udtrykker modent LeIFA inden i cellen, men secernerer ikke.

25 Fig. 9 belyser en vækstkurve for disse to gærstammer i YNB+CAA (Trp⁺-selektiv vækst). Log-fasen fortsætter til en absorbans ved 660 nm på 3-4, og derpå begynder den stationære fase. Begge kurver er i hovedsagen identiske (hvilket tyder på, at produktionen af disse to forskellige-

30 lige proteiner [LeIFA og (præD/A)LeIFA] ikke påvirker gærvækst eller levedygtigheden). Bioprøvninger udførtes på mediet ved forskellige tider under cellevæksten for

at undersøge vækstkurvens afhængighed af disse to stam-
mers produktion af interferon i mediet. Det er klart
ud fra disse resultater, at præsekvensen på LeIFA
frembringer en frigørelse af interferonaktivitet i
5 mediet. Uden denne sekvens frigøres i hovedsagen in-
gen aktivitet. Det er også klart, at aktivitetsni-
veauerne i mediet når et maksimum nær ved den statio-
nære fase.

Rensning af (præD/A)LeIFA fra mediet

10 For at bestemme arten af sekretionsprocessen for (præD/A)-
LeIFA i gæringsmediet var det nødvendigt at rense pro-
teinproduktet fra mediet. Hvis gæren er i stand til at
secernere proteinet, forarbejder den sandsynligvis den
aminoterminalende på en eller anden måde under se-
15 kretionsprocessen, som pattedyrceller normalt gør med
et præ-interferon-protein. Formålet med yderligere for-
søg var at bestemme arten af denne forarbejdning som føl-
ger:

A) 5 liter gæring

20 Fig. 10a viser interferonaktiviteten inden i cellevæggen
og i cellen under den samme gæring. Disse ekstrakter
blev opnået ved pelletering efterfulgt af glaskuglebe-
handling i 7M G·HCl, således at denne aktivitet omfatter
både intracellulært og intracellevæg-materiale. Denne
25 aktivitet nåede et maksimum på omkring 25×10^6 U/l ved
en A_{660} på 1,5 - 2,0, hvilket tyder på at den intracel-
lulære interferonproduktion ender i log-fasen før den
stationære fase til forskel fra ekstracellulært mate-
riale. Således secernerer omkring 8% af aktiviteten frit
30 til mediet. Imidlertid kan der være lige så megen akti-
vitet i cellevæggen (se tabel 1). Ekstraktmaterialet in-
deholder mest intracellulært interferon, og dette mate-

riale renses herefter for at se, om det er forarbejdet eller uforarbejdet.

Fig. 10b viser en vækstkurve for en 5 liter gæring af YEplPT-præLeIFA 53t/pep4-3 i YNB+CAA. Ved gæringens afslutning var der omkring $2,0 \times 10^6$ U/l interferon-aktivitet ved MDBK-prøvninger. Igen ses den maksimale produktion ved stationær fase. Det bør bemærkes, at interferonproduktet i dette medium er meget stabilt, selv med 24 timers yderligere rystning ved 30 °C, efter at den stationære fase er nået. Dette medium blev anvendt til yderligere rensningstrin.

B) Mediekoncentrat på immunoaffinitetssøjle

Mediet fra YEplPT-præLeIFA53t/pep4-3 blev først ultrafiltreret. Dette koncentrat blev sat på en søjle indeholdende et monoklonalt antistof til modent LeIFA. Efter vaskning med 0,2 M NaCl i "tris"/cys/EDTA, pH = 8,0 blev interferonet elueret med vand (pH = 5,5) som vist i fig. 11. Det eluerede maksimum A (pilen repræsenterer da der blev påført vand) blev opnået ved denne procedure og repræsenterer 50 % af den aktivitet, som blev sat på søjlen. Maksimum A blev hældt sammen, som vist med klamme, og anvendt til yderligere rensning. Eluering med 0,2 M eddikesyre resulterede i maksimum B (pilen repræsenterer punktet for pufferændring), og position C repræsenterer punktet for påføring af oprindelig vaskepuffer.

C) HPLC-forløb af maksimum A aktivitet

Maksimum A fraktioner blev lyophiliseret til tørhed og derpå ført på HPLC (se "Metoder"). Fig. 12 belyser resultaterne af dette forløb. En 2,5 µg prøve af rensset LeIFA (fra E. coli) blev kørt separat som kontrol.

Både standarden og (præD/A)LeIFA (eller præLeIFA) havde identiske tilbageholdelsestider, som det ses i figuren. Disse resultater viser, at interferonet fra mediet er forarbejdet, da præLeIFA har en meget forskellig tilbageholdelsestid. Den skyggelagte fraktion fra dette HPLC-forløb blev derpå anvendt til proteinsekvensbestemmelse.

NH₂-terminal-sekvens af (præD/A)LeIFA rensset fra gærmedie

Fig. 13 viser delvis resultaterne af sekvensbestemmelse af det rensede interferon. Den øvre sekvens er den, der forventes for (præD/A)LeIFA, hvis der ikke sker nogen forarbejdning. Det normale spaltningspunkt for dette interferon, der sandsynligvis genkendes af pattedyr-celler, er vist.

Proteinsekvensen blev fortolket ved notering af, hvilken PTH-aminosyre, der blev forøget i hver tilsvarende Edman-cyklus og derpå formindsket i den følgende cyklus. PTH-aminosyre, der normalt giver lave genvindinger (cys, ser, thr, arg, his), blev antaget, når der ikke sås forøgelse i nogen anden PTH-aminosyre. Mængden i mg blev bestemt ved sammenligning af arealerne af den fortolkede rest med arealet fra en standardblanding af PTH-aminosyrer kørt på den samme HPLC. En indre standard af norleucin blev indført i hvert chromatogram for at sikre, at tilbageholdelsestiderne var reproducerbare.

Fig. 13 viser de opnåede proteinsekvensbestemmelsesresultater for det rensede (præD/A)LeIFA. Den sekvens, der måtte forventes, hvis der ikke skete nogen forarbejdning, og det normale spaltningspunkt for dette præinterferon i pattedyrceller er også vist. To uafhængige sekvensbestemmelser blev gennemført på to forskellige rensede

prøver fra celler og medie. Fig. 13 viser, at det meste af interferonet i mediet blev forarbejdet rigtigt (64 %), men en anden form (36 %) indeholdende tre yderligere aminosyrer af præsekvensen var også til stede. Det intracellulære interferon indholdt også disse to former, men i lidt forskellige mængdeforhold såvel som en tredje form indeholdende 8 aminosyrer af præsekvensen. Den fulde længde af præsekvensen blev aldrig iagttaget, hvilket tyder på, at gær forarbejder al præ-IFN på en eller anden måde.

Det er muligt, at den forarbejdede form indeholdende tre aminosyrer af præsekvensen var et resultat af præ-D/A-signalsekvensens hybride art. Derfor blev forarbejdningen af den ikke-hybride (præD)LeIFD også undersøgt. PræD er kun forskellig fra præD/A ved aminosyrepositionen -2 (leu i stedet for val). Når forarbejdningen af præ-IFN- α 1 renses fra mediet blev undersøgt, iagttoges igen både +1 og -3 formerne (fig. 13). Imidlertid var en mindre betydende art også til stede i mediet som en -14 form, som ikke blev set for (præD/A)-LeIFA.

For at undersøge sekretionen af heterologe proteiner fra *S. cerevisiae* har vi konstrueret plasmider til in vivo transcription af generne for flere modne interferoner (IFN'er) og flere præ-IFN'er. Når som helst kodningssekvenserne for hydrofobe signalpeptider var til stede, kunne antiviral IFN-aktivitet udvindes både fra værtscellerne og fra dyrkningsmediet, medens alt det IFN, hvis syntese var dirigeret af modne IFN-gener, forblev inden i cellerne. Vi har forsøgt at karakterisere kravene til sekretion ved at foretage konstruktioner, hvori interferongen ville være forsynet med dets egne naturlige signalsekvenser, som i (præD)LeIFD, eller ville være forsynet med en hybrid signalsekvens udformet som en

sammensætning af to IFN- α -arter, som i (præD/A)LeIFA. Selv om gærcellerne, som indeholdt disse konstruktio-
ner, i almindelighed secernerede IFN til dyrknings-
mediet, varierede mængden af aktivitet mellem stam-
5 merne, og de rensede og sekvensbestemte IFN-arter
varierede også.

Tre former af ikke-secerneret interferon, som udgjorde
90 % af det totale udtrykte interferon, blev rensat
fra celler indeholdende (præD/A)LeIFA-genet. Én form
10 (33 %) blev rigtigt forarbejdet (+1, fig. 13), en an-
den form (55 %) indeholdt tre yderligere aminosyrer
(-3, fig. 13), og en tredje form (11 %) indeholdt otte
yderligere aminosyrer (-8). Den sidste form blev ikke
set i mediet, medens IFN med en præsekvens i fuld læng-
15 de aldrig blev iagttaget i cellerne eller mediet.

Forarbejdning af (præD)LeIFD

I stedet for den rystekolbevækst, som blev anvendt for
(præD/A)LeIFA-gær blev (præD)LeIFD-udtrykkende gær dyr-
ket i en 10 liters fermentor til en $A_{550} = 60$.

20 Når forarbejdningen af (præD)LeIFD rensat fra mediet
(rensningen var den samme som for præD/ALeIFA) blev
undersøgt, iagttoges både +1 og -3 formerne (fig. 13).
En yderligere, mindre betydende art var også til stede
i mediet som en -14 form. Der var ingen tegn på, at der
25 skete cellelyse i kulturen, når den blev undersøgt ved
SDS-gel-elektroforese af medieprotein over for cellulære
proteiner. Interessant nok blev der ved denne høje vækst-
densitet iagttaget en meget høj procent sekretion (30 %)
i mediet for LeIFD. Højdensitetsgøringer af (præD/A)LeIFA-
30 udtrykkende gær viser også denne højere procent sekretion.

Gær viser sig at forarbejde både det secernerede og ikke-secernerede interferon. Den secernerede mængde aktivitet varierer afhængigt af cellernes vækststadium, således at der forekommer maksimale procenter ved stationær fase i rystekolber og ved afslutningen af højdensitetsgæringer (30 % i mediet).

Bekræftelse af sammensætningen af plasmiderne i YEplPT-præLeIFA53t- og YEplPT-LeIFA1-holdig gær

Gæren indeholdende disse to plasmider og anvendt til de forudgående forsøg blev yderligere undersøgt ved genvinding af plasmiderne fra gæren. Dette blev gjort ved isolering af plasmid-DNA'en fra gærekstrakt ved transformation af E. coli efterfulgt af miniscreen-DNA-præparation og restriktionsanalyse af plasmid-DNA'erne. Flere E. coli isolerede plasmid-DNA'er blev karakteriseret for begge typer gær. I alle tilfælde indeholdte plasmiderne den forventede restriktionssekvens, hvilket bekræfter tilstedeværelsen af præsekvensen på det (præD/A)LeIFA-holdige plasmid og manglen af den på det modent-LeIFA-holdige plasmid.

Restriktionskort og delvis sekvensbestemmelse af 3,1 kb indsætning i pB1

300 µg pB1 (37a) blev fuldstændigt nedbrudt med HindIII i et 500 µl reaktionsvolumen og derpå elektroforeret på en præparativ agarosegel (Sea Kem) indeholdende 1 % agarose. 3,1 kb HindIII indsætningen blev udskåret fra den ethidiumfarvede gel, elektroelueret (39), ekstraheret to gange med lige store volumener puffermættet phenol og chloroform før ethanol-fældning. Portioner af det gænsuspenderede DNA-fragment blev opdelt og underkastet restriktionsklipninger med en gruppe forskellige restriktionszymer for at give det i fig. 15 viste delvise restriktionskort.

30 μ g af den rensede 3,1 kb indsætning blev klippet med Sau3A og derpå kørt på en 6 % acrylamidgel. Fragmenter svarende til de 265 bp og 141 bp blev separat rensat ved elektroeluering som beskrevet ovenfor.

5 Hvert DNA-fragment blev derpå underkastet DNA-sekvensanalyse (39).

En portion af denne DNA-sekvens er vist i fig. 16. Aminosyrer svarende til de N-terminale aminosyrer i PGK-strukturgenet er trykt over DNA-sekvensen.

10 Indsætning af et restriktionssted i PGK-5'-promotorområdet

Et syntetisk oligonucleotid med sekvensen 5'ATTGTGTGTTAA3' blev syntetiseret ved standardmetoder (40). 100 ng af denne primer blev mærket ved 5'-enden under anvendelse af 10 enheder T_4 -polynucleotidkinase i en 20 μ l reaktion, der også indeholdt 200 μ Ci [γ - 32 P] ATP. Denne

15 mærkede primeropløsning blev anvendt i en primer-reparations-reaktion udformet til at være det første trin i en flertrins-proces til at indføre et EcoRI-restriktionssted i den 5'-flankerende PGK-DNA lige før

20 PGK-strukturgen-sekvensen. Denne flertrins-proces er forklaret nedenfor:

Trin 1 (fig. 17)

Primer-reparations-reaktioner og kloning af et 39bp

25 XbaI-til-Sau3A-stykke.

100 μ g pBl blev fuldstændigt nedbrudt med HaeIII og derpå kørt på en 6 % polyacrylamidgel. Det øverste bånd på den ethidiumfarvede gel (indeholdende PGK-promotor-område) blev isoleret ved elektroeluering som beskrevet

30 ovenfor. Dette 1200 bp HaeIII-stykke DNA blev restrikti-

onsbehandlet med HindII og derpå kørt på en 6 % acryl-
 amidgel. 650 bp båndet blev isoleret ved elektroelue-
 ring. Der blev isoleret 5 μ g DNA. Dette 650 bp
 HaeIII-til-HindII-stykke DNA blev gensuspenderet i
 5 20 μ l deioniseret vand og derpå blandet med de 20 μ l
 af den ovenfor beskrevne phosphorylerede primerop-
 løsning. Denne blanding blev ekstraheret en gang med
 phenol/chloroform og derpå ethanol-fældet. Den tørrede
 DNA blev gensuspenderet i 50 μ l vand og derpå opvarmet
 10 i et kogende vandbad i 7 minutter. Denne opløsning blev
 derpå hurtigt afkølet i et tøris/ethanol-bad (10-20
 sekunder) og derpå overført til et is-vand-bad. Til
 denne opløsning sættes 50 μ l af en opløsning indehol-
 dende 10 μ l 10X DNA-polymerase I-puffer (Boehringer
 15 Mannheim), 10 μ l af en i forvejen fremstillet opløsning,
 som var 2,5 mM med hensyn til hvert deoxynucleosidtri-
 phosphat (dATP, dTTP, dGTP og dCTP), 25 μ l deioniseret
 vand og 5 enheder DNA-polymerase I, Klenow-fragment.
 Denne 100 μ l reaktionsblanding blev inkuberet ved 37 °C
 20 i 4 timer. Opløsningen blev derpå ekstraheret 1 gang
 med phenol/chloroform, ethanol-fældet, tørret ved lyo-
 philisering og derpå restriktionsbehandlet helt ud med
 10 enheder Sau3A. Denne opløsning blev derpå kørt på
 en 6 % acrylamidgel. Båndet svarende til 39 bp i stør-
 25 relse blev udskåret fra gelen og derpå isoleret ved elek-
 troeluering som beskrevet ovenfor. Dette 30 bp fragment
 har en stump ende og en Sau3A-kohæsiv ende. Dette
 fragment blev klonet ind i en modificeret pFIFtrp69-
 vektor (10). 10 μ g pFIFtrp69 blev lineariseret med XbaI,
 30 ekstraheret en gang med phenol/chloroform og derpå etha-
 nolfældet. Den XbaI-kohæsive ende blev fyldt ud under
 anvendelse af DNA-polymerase I-Klenow-fragment i en 50 μ l
 reaktionsblanding, som var 250 μ M med hensyn til hvert
 nucleosidtriphosphat. Denne DNA blev klippet med BamHI
 35 og derpå kørt på en 6 % acrylamidgel. Vektorfragmentet
 blev isoleret fra gelen ved elektroeluering og derpå gen-

suspenderet i 20 μ l deioniseret vand. 20 ng af denne vektor blev ligeret med 20 ng af det ovenfor syntetiserede 39bp fragment i 4 timer ved stuetemperatur. En femtedel af denne ligeringsblanding blev anvendt

5 til at transformere E. coli stamme 294 til ampicillin-resistens (på LB + 20 μ g/ml amp-plader). Plasmider fra transformanterne blev undersøgt ved en hurtig oversigtsprocedure (20). Et plasmid, pPGK-39 (fig. 17) blev udvalgt til sekvensanalyse. 20 μ g af dette plas-

10 mid blev nedbrudt med XbaI, ethanol-fældet og derpå behandlet med 1000 enheder bakteriel alkalisk phosphatase ved 68 °C i 45 minutter. DNA'en blev ekstraheret tre gange med phenol-chloroform og derpå ethanol-fældet. De dephosphorylerede ender blev derpå mærket i en 20 μ l

15 reaktionsblanding indeholdende 200 μ Ci [γ - 32 P] ATP og 10 enheder T₄-polynucleotidkinase. Plasmidet blev klippet med SalI og kørt på en 6 % acrylamidgel.

Båndet med den mærkede indsætning blev isoleret fra gelen og sekvensbestemt ved den kemiske nedbrydningsmetode

20 (39). DNA-sekvensen ved 3'-enden af dette promotorstykke var som forventet.

Irin 2 (fig. 18)

Konstruktion af et 312 bp PvuI-til-EcoRI PGK-promotorfragment.

25 25 μ g pPGK-39 (fig. 17) blev samtidigt nedbrudt med SalI og XbaI (fem enheder hver) og derpå elektroforeret på en 6 % gel. 390 bp båndet indeholdende 39 bp promotorstykket blev isoleret ved elektroeluering. Den gensuspenderede DNA blev restriktionsbehandlet med Sau3A og

30 derpå elektroforeret på en 8 % acrylamidgel. 39 bp PGK-promotorbåndet blev isoleret ved elektroeluering. Denne DNA indeholdt 39 bp af 5'-enden af PGK-promotoren på et Sau3A-til-XbaI fragment.

25 μ g pBl blev restriktionsbehandlet med PvuI og KpnI og derpå elektroforeret på en 6 % gel. 0,8 kbp båndet af DNA blev isoleret ved elektroeluering og derpå restriktionsbehandlet med Sau3A og elektroforeret på en 6 % gel. 265 bp båndet fra PGK-promotoren (fig. 15) blev isoleret ved elektroeluering.

Denne DNA blev derpå ligeret med det ovenfor fremstillede 39 bp promotorfragment i 2 timer ved stuetemperatur. Ligeringsblandingen blev restriktionsbehandlet med XbaI og PvuI og derpå elektroforeret på en 6 % acrylamidgel. 312 bp XbaI-til-PvuI restriktionsfragmentet blev isoleret ved elektroeluering og derpå sat til en ligeringsblanding indeholdende 200 ng pBR322 (33) [i forvejen isoleret uden 162 bp PvuI-til-PstI restriktionsfragmentet] og 200 ng af XbaI-til-PstI LeIFA-cDNA-genet, som i forvejen var isoleret fra 20 μ g pLeIFtrpA. Denne 3-faktor-ligeringsblanding blev anvendt til at transformere E. coli stamme 294 til tetracyclinresistens. Transformantkolonier blev miniscreenet, og en af kolonierne, pPGK-300, blev isoleret som havende 304 bp PGK-5'-flankerende DNA sammensmeltet med LeIFA-genet i en pBR322-baseret vektor. 5'-enden af LeIFA-genet har den følgende sekvens: 5'-CTAGAAATTC-3', således at tilknytning af XbaI-stedet fra PGK-promotorfragmentet til denne sekvens muliggør tilføjelsen af et EcoRI-sted til XbaI-stedet. pPGK-300 indeholder således en del af PGK-promotoren isoleret i et PvuI-til-EcoRI fragment.

Irin 4 (fig. 19)

30 Konstruktion af et 1500 bp EcoRI-til-EcoRI PGK-promotorfragment.

10 μ g pBl blev nedbrudt med PvuI og EcoRI og kørt på en 6 % acrylamidgel. 1,3 kbp PvuI-til-EcoRI DNA-båndet fra

den PGK-5'-flankerende DNA blev isoleret ved elektro-
 eluering. 10 μ g pPGK-300 blev nedbrudt med EcoRI
 og PvuI, og 312 bp promotorfragmentet blev isoleret ved
 elektroeluering efter elektroforering af nedbrydnings-
 5 blandingen på en 6 % gel. 5 μ g pFRL4 blev klippet
 med EcoRI, ethanol-fældet og derpå behandlet med bak-
 teriel alkalisk phosphatase ved 68 °C i 45 minutter.
 Efter tre gange behandling af DNA'en med phenol/chlo-
 roform, ethanol-fældning og gensuspension i 20 ml de-
 10 ioniseret vand blev 200 ng af vektoren ligeret med
 100 ng 312 bp EcoRI-til-PvuI DNA fra pPGK-300 og 100 ng
 EcoRI-til-PvuI DNA fra pBl. Ligeringsblandingen blev
 anvendt til at transformere E. coli stamme 294 til am-
 picillinresistens. Fra en af de ampicillinresistente
 15 kolonier blev opnået pPGK-1500. Dette plasmid indehol-
 der 1500 bp PGK-promotorfragmentet som et EcoRI-til-
 EcoRI eller HindIII-til-EcoRI DNA-stykke.

Konstruktion af modent-HGH-(humant væksthormon) og
præHGH-udtrykkelsesplasmider

20 Konstruktionerne A-E i fig. 14 blev konstrueret i vek-
 torer med hensigtsmæssige restriktionssteder. I kon-
 struktion A blev der fremstillet en syntetisk DNA til
 at duplikere DNA-sekvensen ved begyndelsen af præHGH-
 cDNA'en (42) fra HpaII-stedet med dannelse af et EcoRI-
 25 sted foran ATG-translationsstartcodonen. HpaII-til-
 PstI fragmentet blev opnået ud fra præHGH-cDNA'en (42),
 og dette fragment med den syntetiske DNA blev ligeret
 med en EcoRI-til-PstI vektor (pHGH 207-1 med EcoRI-til-
 PstI fragmentet indeholdende en del af Ap^R-genet fjernet
 30 og begge steder genligeret efter Klenow-udfyldning for at
 fjerne begge restriktionssteder) indeholdende PstI-til-
 SmaI fragmentet af HGH-cDNA'en (43) til opnåelse af kon-
 struktion A. Konstruktion B blev fremstillet ud fra et
 plasmid indeholdende det modne HGH-gen, som i forvejen

var blevet hængt på til direkte udtrykkelse indeholdende 23 aminosyrer af en syntetisk kodningssekvens ved den NH_2 -terminale ende (44). Et plasmid indeholdende dette gen blev klippet med PvuII i HGH-genet og BamHI i Tc^R -genet. Det store fragment indeholdende det meste af genet blev derpå ligeret med syntetisk DNA, som duplikerer enden af HGH-genet (TAG) og skaber et HindIII-sted. Dette HindIII-sted blev ligeret med HindIII-til-BamHI fragmentet af pBR322 som den tredje faktor af en 3-faktor-ligering til opnåelse af et plasmid indeholdende konstruktion B.

A og B blev derpå kombineret som vist i fig. 14 til dannelse af konstruktion C. C blev yderligere modificeret til dannelse af D, hvor HindIII-stedet var omdannet til et EcoRI- (eller EcoRI)-sted. Det således opnåede EcoRI-stykke blev anbragt i EcoRI-stedet af gærudtrykkesplasmidet YEplPT til udtrykkelse af præHGH-genet i gær. Konstruktion E blev også fremstillet under anvendelse af den i D anvendte omdanner til opnåelse af et modent interferon-gen (uden sekretionssignalsekvensen) på et EcoRI-fragment til udtrykkelse i YEplPT.

Udtrykkelse af modent HGH og præ-HGH i gær

Modent-HGH-konstruktionen (E) i YEplPT blev anbragt i stamme pep4-3 trp1 (20B-12), og der blev fremstillet ekstrakter under anvendelse af glaskugler som beskrevet under "Metoder". Imidlertid sættes glaskugler til 10 ml pelleterede celler med 0,5 ml 0,1 % SDS. Der blev foretaget fortyndinger i hesteserum og udførtes RIA-prøvnin-

ger som tidligere beskrevet (44). Ved RIA blev HGH udtrykt som omkring 0,5 % af det totale gærprotein ved en A_{660} på 1,0 (0,5 mg/l/ A_{660}). Intet HGH blev sporet i mediet.

Præ-HGH-konstruktionen (D) i YEplPT blev også indført i gær, og celler og medium blev prøvet for HGH. Der blev sporet et lavere niveau af udtrykkelse i cellen (0,08 mg/l/ A_{660}) eller omkring 0,08 % af det totale gærprotein. Således er niveauet omkring 1/6. af niveauet for modent-HGH-udtrykkelse, hvilket meget ligner leukocyt-interferon-resultaterne. Imidlertid behøver dette ikke at være en fair sammenligning, da codonforbruget til modent HGH (44) er forskelligt for 23 aminosyrer i forhold til præ-HGH. En sådan forskel kan resultere i forskelle i udtrykkelsesniveauet af disse to produkter (45). 10 % eller 8 μ g/l/($A_{660} = 1$) af det i cellen udtrykte niveau fandtes i mediet for den præ-HGH-udtrykkende gær. I en 10 liters fermentor ved en $A_{550} = 85$ var der igen omkring 10 % sekretion med 1 mg/l HGH i mediet.

Arten af præ-HGH-udtrykkelse

En sammenligning af HGH-protein i cellen i forhold til uden for cellen blev udført ved anvendelse af en Western-dupningsprocedure som beskrevet ovenfor. Resultaterne viser medium fra en højdensitetsgøring ($A_{550} = 85$) af præ-HGH-udtrykkende gær. Der findes et enkelt bånd svarende til modent HGH i størrelse. Dette bånd svarer til 1 - 2 % af gærmedieproteinet.

Når dette medie-HGH blev rensset ved antistof-affinitetschromatografi (Hybritech Ab) og HPLC som anvendt for interferonerne, viste NH_2 -terminalsekvensanalyse, at næsten 100 % af HGH'et var modent HGH (sekvensanalyse udførtes for 10 rester) som vist delvis i fig. 13. Således forarbejdes al medie-HGH'et pålideligt, som det gøres af humane celler.

BIBLIOGRAFI

1. Novick, P., Field, C., and Schekman, Cell 21, 205-215 (1980).
2. Duntze, et al., Science 168, 1472 (1970).
3. Woods, et al., J. Gen. Microbiol. 51, 115 (1968).
4. Cabib, et al., J. Bacteriology 124, 1586 (1975).
5. Farkas, Microbiol. Rev 43, 117 (1979).
6. Moor, Arch. Mikrobiol. 57, 135 (1967).
7. Goeddel, et al., Nature 287, 411 (1980).
8. Goeddel, et al., Nature 290, 20 (1981).
9. Yelverton, et al., Nucleic Acids Research 9, 731 (1981).
10. Goeddel, et al., Nucleic Acids Research 8, 4057 (1980).
11. Wetzel, American Scientist 68, 664 (1980).
12. Wetzel, et al., Biochemistry 19, 6096 (1980).
13. Davis, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 78, 5376 (1981).
14. Hitzeman, et al., Nature 293, 717 (1981).
15. Kleid, et al., Science 214, 1125 (1981).
16. Lawn, et al., Nucleic Acids Res. 9, 6103 (1981).
17. Weck, et al., Nucleic Acids Res. 9, 6153 (1981).
18. Clarke, L. and Carbon, J. Cell 9, 91-99 (1976).
19. Clarke, L. and Carbon, J. PNAS 72, 4361-4365 (1975).
20. Birnboim, H.C., and Doly, J. Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523 (1979).
21. Hinnen, A., Hicks, J.B., and Fink, F.R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 1929-1933 (1978).

22. Backman, K., Ptashne, M., and Gilbert, W., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 4174-4178 (1976).
23. Jones, E. Genetics 85, 23 (1976).
24. Faye, G., Leung, D.W., Tachell, K., Hall, B.D., and Smith, M. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2258-2262 (1981).
25. Miller, J.H., Experiments in Molecular Genetics, pp. 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
26. Stewart, W.E. II The Inteferon System (Springer, New York, 1979).
27. P. Edman, G. Begg, "A Protein Sequencer" Eur. J. Biochem., 1, 80-91 (1967).
28. Tarr, G.E., Beecher, J.F. Bell, M. and McKean, D.J. Anal. Biochem. 84, 622-627, (1978).
29. Wittmann-Liebold, B., Graffunder, H., and Kohls, H. Anal. Biochem. 75, 621-633 (1976).
30. Gray, P.W., et al., Nature 295, 503-508 (1982).
31. Emr, S.D., et al., Nature 285, 82-85 (1980).
32. Novick, P. and Schekman. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1858-1862 (1979).
33. Bolivar, F., Rodriguez, R.L, Green, P.Y., Betlach, M.C., Heyneker, H.L., Boyer, H.W., Crosa, Y.H., and Falkow, S. Gene 2, 95-113 (1977).
34. Stinchcomb, D.T., Struhl, K., and Davis, R.W. Nature 282, 39-43 (1979).
35. Kingsman, A.J., Clarke, L., Mortimer, R., and Carbon, J.

- Gene 7, 141-153 (1979).
36. Tschumper, G., and Carbon, J. Gene 10, (1980).
 37. Hartley, J.L. and Donelson, J.E. Nature 286, 860-865 (1980).
 - 37a. Hitzeman, R.A., Clarke, L., and Carbon, J. J. Biol. Chem. 255, 12073 (1980).
 - 37b. Broach et al., Gene 8, 121 (1979).
 38. Messing, et al., Nucleic Acids Research 9, 309 (1981).
 39. Maxam, A.M., and Gilbert, W. Methods in Enzymol. 65, 490-565 (1980).
 40. Crea, R. and Horn, T. Nucleic Acids Res. 8, 2331-2348.
 41. Oakley, B.R. et al., Anal. Biochem. 105, 361 (1980).
 42. Goodman, H.M., et al. in Specific Eukaryotic Genes (Eds. Engberg, J., Klenow, H., and Leick, V.) 179-190 (Munksgaard, Copenhagen, 1979).
 43. DeBoer, H., et al. in Promoters: Structure and Function (eds. Prayer) pp. 468-481 (1982).
 44. Goeddel, D.V. et al., Nature 281, 544 (1979).
 45. Bennetzen, J.L., and Hall, B.D., J. Biol. Chem. 257, 3026 (1982).
 46. Ames, G.F.-L., J. Biol. Chem. 249, 634 (1974).
 47. Towbin, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350 (1979).

P a t e n t k r a v :

1. Fremgangsmåde til fremstilling af et pattedyrprotein,
5 som er heterologt for en gærorganisme, som produkt af
gær-udtrykkelse, -forarbejdning og -sekretion, k e n d e -
t e g n e t ved, at der foretages dyrkning af levedyg-
tige gærceller transformeret med et udtrykkelsesmedium,
som funktionelt indeholder DNA, der koder for det nævnte
10 pattedyrprotein sammen med et heterologt signalpolypeptid,
hvilket heterologe signalpolypeptid er heterologt for gæren
og ikke normalt produceres eller anvendes af den nævnte
gærorganisme, hvilken dyrkning resulterer i sekretion af
det nævnte pattedyrprotein til dyrkningsmediet, og det
15 nævnte pattedyrprotein udvindes fra dyrkningsmediet.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t
ved, at det heterologe signalpolypeptid er nativt for det
heterologe pattedyrprotein.
- 20 3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g -
n e t ved, at det nævnte protein er et humant inter-
feron.
- 25 4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t
ved, at proteinet er et humant leukocytinterferon.
5. Fremgangsmåde ifølge krav 4, k e n d e t e g n e t
ved, at proteinet er humant leukocytinterferon A eller D.
- 30 6. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-5, k e n d e -
t e g n e t ved, at det udvundne secernerede protein
er et glycoprotein.
- 35 7. Fremgangsmåde ifølge ethvert af kravene 1-6, k e n d e -
t e g n e t ved, at det heterologe signalpolypeptid er den

N-terminale portion af ét signalpolypeptid og den C-terminale portion af et andet signalpolypeptid, hvor det ene af disse signalpolypeptider er nativt for det nævnte protein.

5 8. Gærorganisme-cellekultur, k e n d e t e g n e t ved, at den omfatter (1) levedygtige gærceller transformeret med et udtrykkelsesmedium, som funktionelt indeholder DNA, der koder for et pattedyrprotein, som er heterologt for de nævnte gærceller, sammen med et heterologt signalpoly-
10 peptid, hvilket heterologe signalpolypeptid ikke normalt produceres eller anvendes af den nævnte gærorganisme, og (2) et medium til understøttelse af cellekulturen, hvilket medium indeholder det nævnte pattedyrprotein som et produkt af gærorganismens udtrykkelse, forarbejdning og se-
15 kretion.

9. Cellekultur ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at det heterologe signalpolypeptid er den N-terminale portion af ét signalpolypeptid og den C-terminale portion
20 af et andet signalpolypeptid, hvor det ene af disse signalpolypeptider er nativt for det nævnte protein.

10. Cellekultur ifølge krav 8 eller 9, k e n d e t e g n e t ved, at gærorganismen er *Saccharomyces cerevisiae*.
25

11. Cellekultur ifølge ethvert af kravene 8-10, k e n d e t e g n e t ved, at proteinet er et glycoprotein fremstillet ifølge ethvert af kravene 1-7.

12. Dyrkningsmedium af en gærorganisme-cellekultur ifølge ethvert af kravene 8-11, k e n d e t e g n e t ved, at det er i det væsentlige frit for levedygtige eller brudte gærceller og indeholder et glycoprotein fremstillet ifølge ethvert af kravene 1-6.
30
35

13. Gærudtrykkesmedium, k e n d e t e g n e t ved, at det funktionelt indeholder DNA, som koder for et protein, der er heterologt for en gærorganisme, og et heterologt signalpolypeptid i translationsaflæsningsramme med den DNA, der koder for det nævnte heterologe protein, hvil-
- 5 ket heterologe signalpolypeptid er den N-terminale portion af ét signalpolypeptid og den C-terminale portion af et andet signalpolypeptid, hvor det ene af disse signalpolypeptider er nativt for det nævnte protein.
- 10 14. Gærudtrykkesmedium ifølge krav 13, k e n d e t e g n e t ved, at det er i stand til i en gærvært at secrete et glycoprotein.
- 15 15. Gærudtrykkesmedium, k e n d e t e g n e t ved, at det funktionelt indeholder DNA, som koder for humant leukocyt-D/A-signalpolypeptid i translationsaflæsningsramme med humant leukocyt-A-protein.

20

25

30

35

Fig.1.

Aminosyresekvenser af sekretionssignaler

	<u>DdeI</u>										DNA														Spaltningssited				
	-23	-22	-21	-20	-19	-18	-17	-16	-15	-14	-13	-12	-11	-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4	-3	-2	-1	+1	+2				
Pre A	Met	Ala	<u>Leu</u>	<u>Thr</u>	Phe	Ala	Leu	Leu	<u>Val</u>	<u>Ala</u>	Leu	<u>Leu</u>	Val	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Cys	Ser	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	Cys	Asp				
Pre D	Met	Ala	<u>Ser</u>	<u>Pro</u>	Phe	Ala	Leu	Leu	<u>Met</u>	<u>Val</u>	Leu	<u>Val</u>	Val	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Cys	Ser	<u>Leu</u>	<u>Gly</u>	Cys	Asp				
Pre D/A	Met	Ala	<u>Ser</u>	<u>Pro</u>	Phe	Ala	Leu	Leu	<u>Met</u>	<u>Val</u>	Leu	<u>Val</u>	Val	Leu	Ser	Cys	Lys	Ser	Ser	Cys	Ser	<u>Val</u>	<u>Gly</u>	Cys	Asp				
Pre Y				Met	Lys	Tyr	Thr	Ser	Tyr	Ile	Leu	Ala	Phe	Gln	Leu	Cys	Ile	Val	Leu	Gly	Ser	Leu	Gly	Cys	Tyr				
Pre B				Met	Thr	Asn	Lys	Cys	Leu	Gln	Ile	Ala	Leu	Leu	Leu	Cys	Phe	Ser	Thr	Thr	Ala	Leu	Ser	Met	Ser				

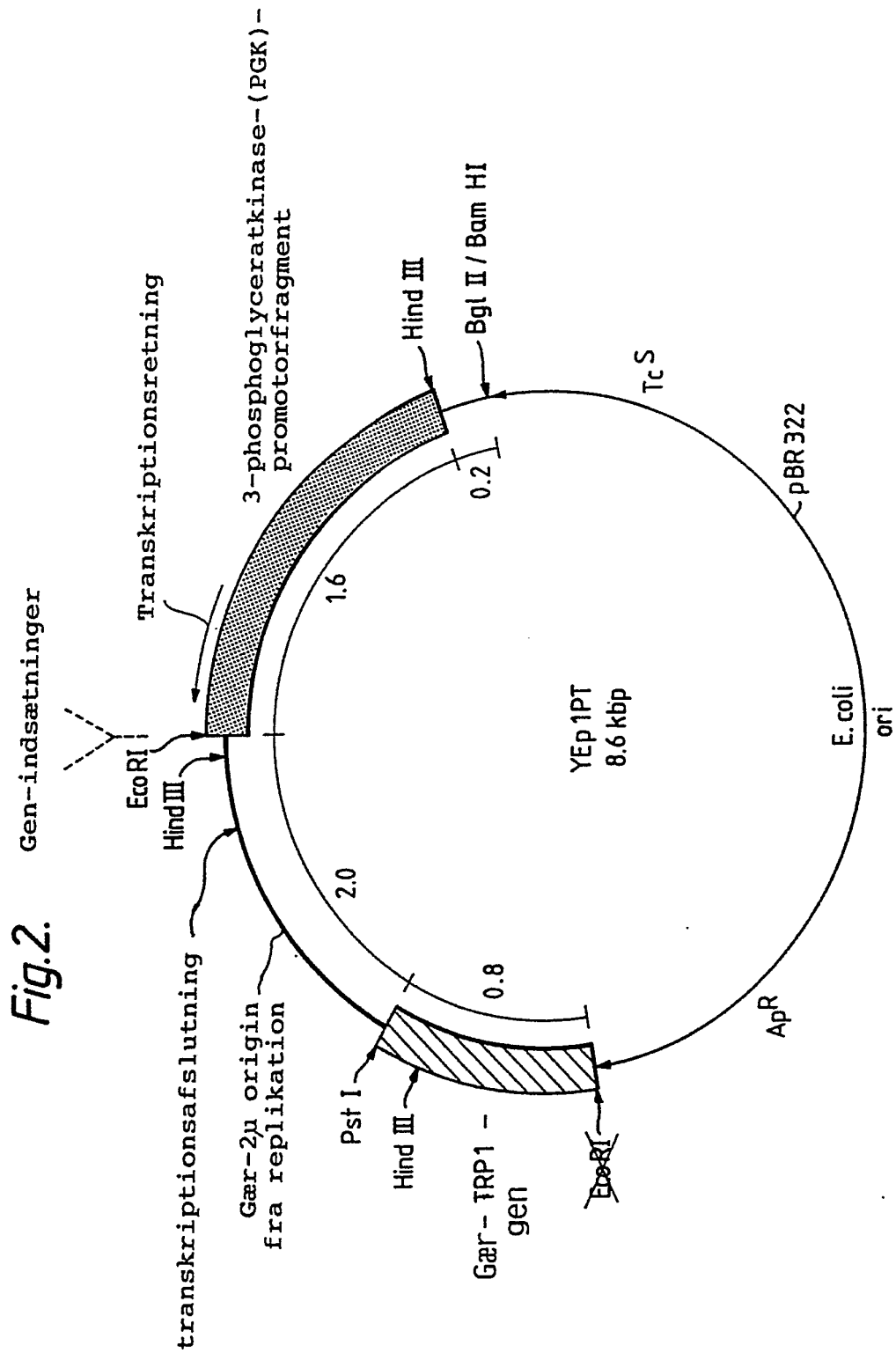


Fig.3.

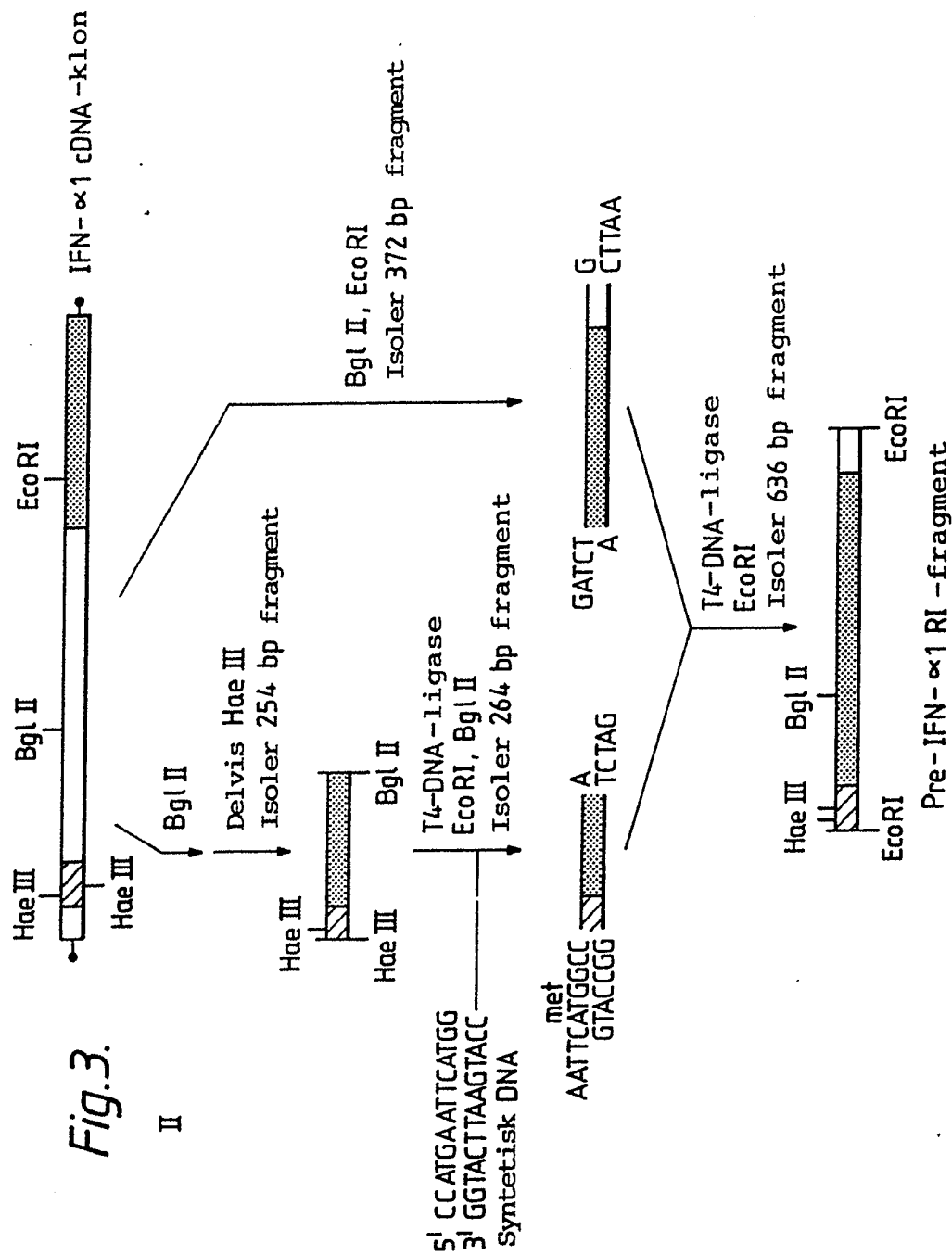


Fig. 4.

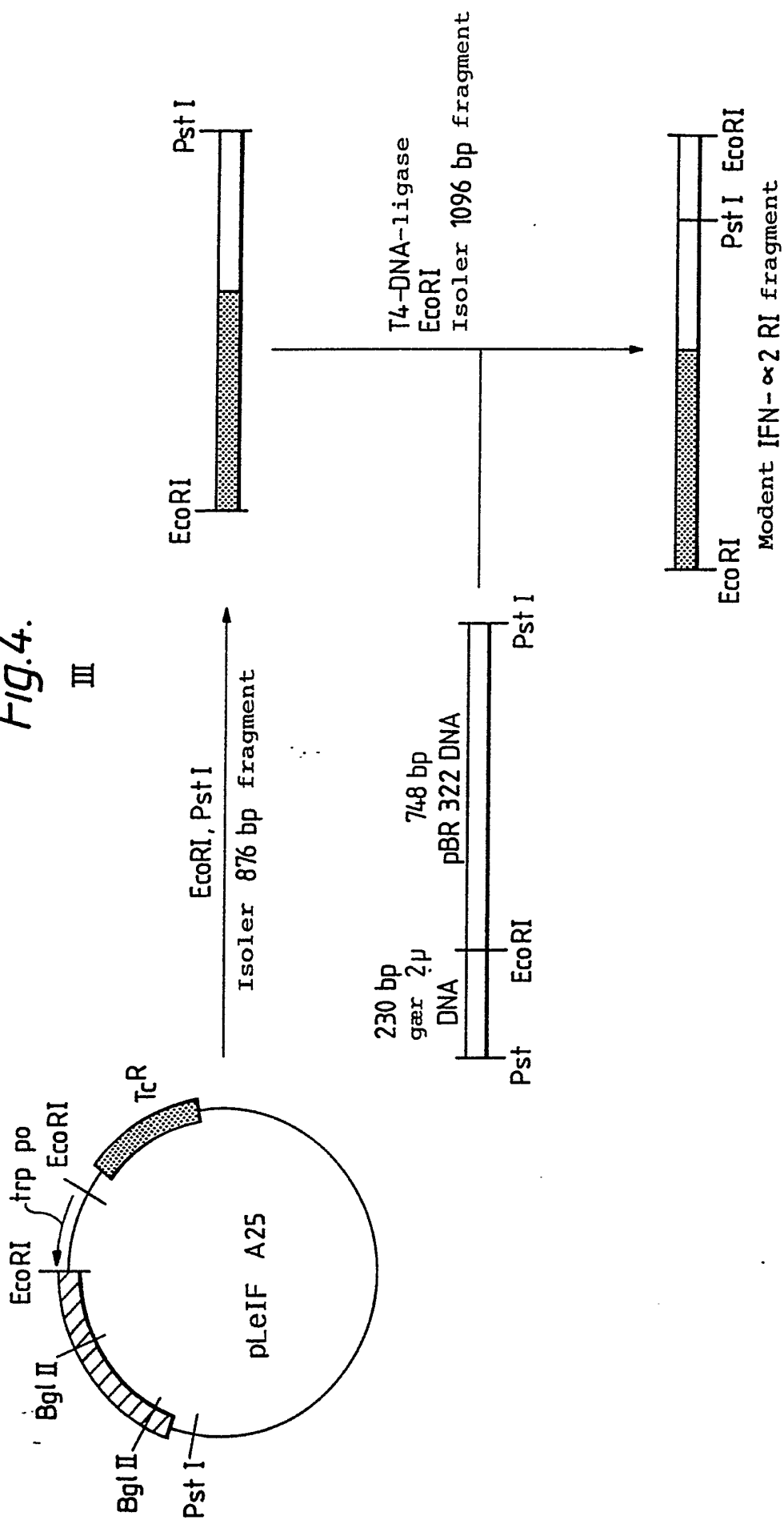


Fig.5.

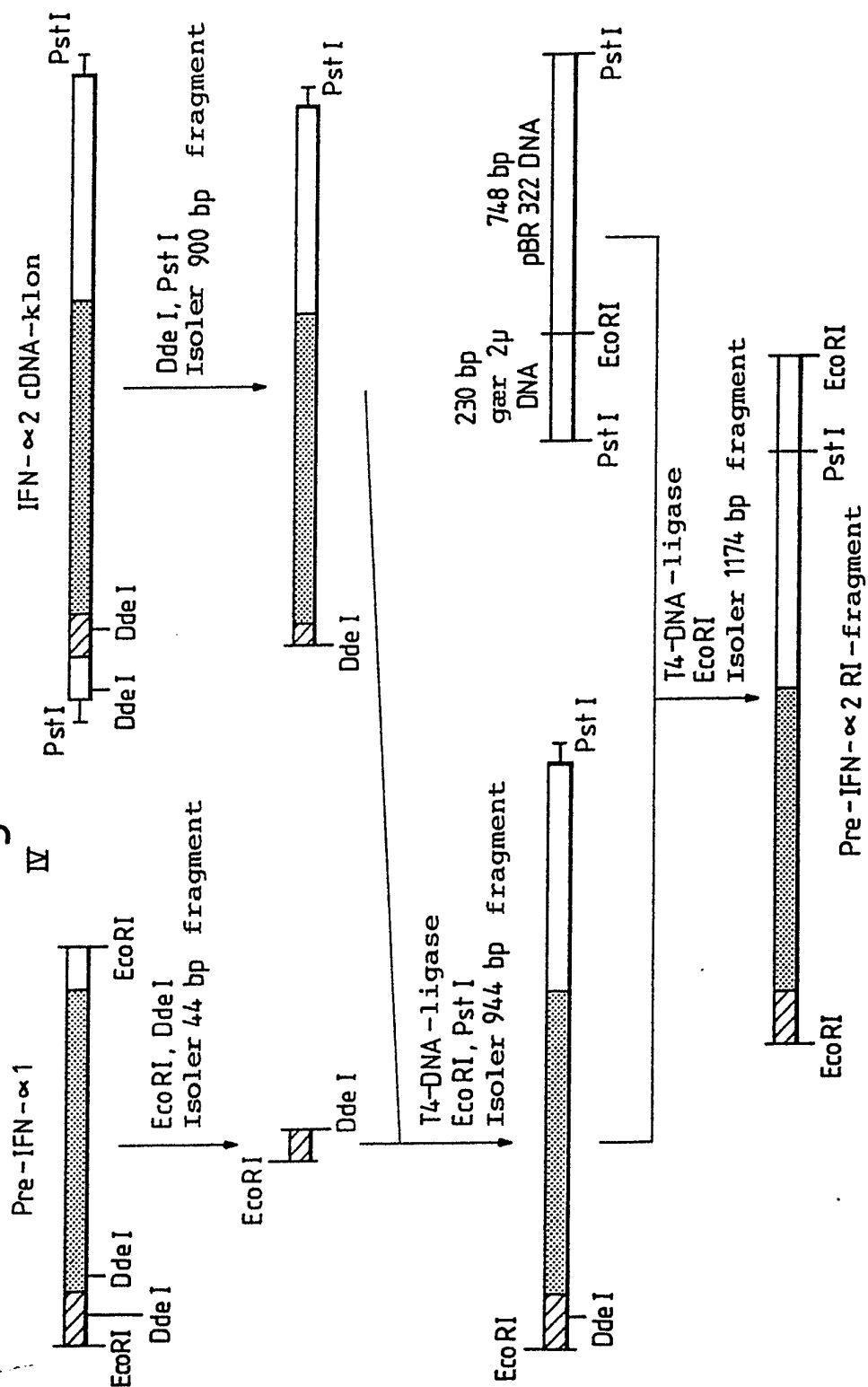
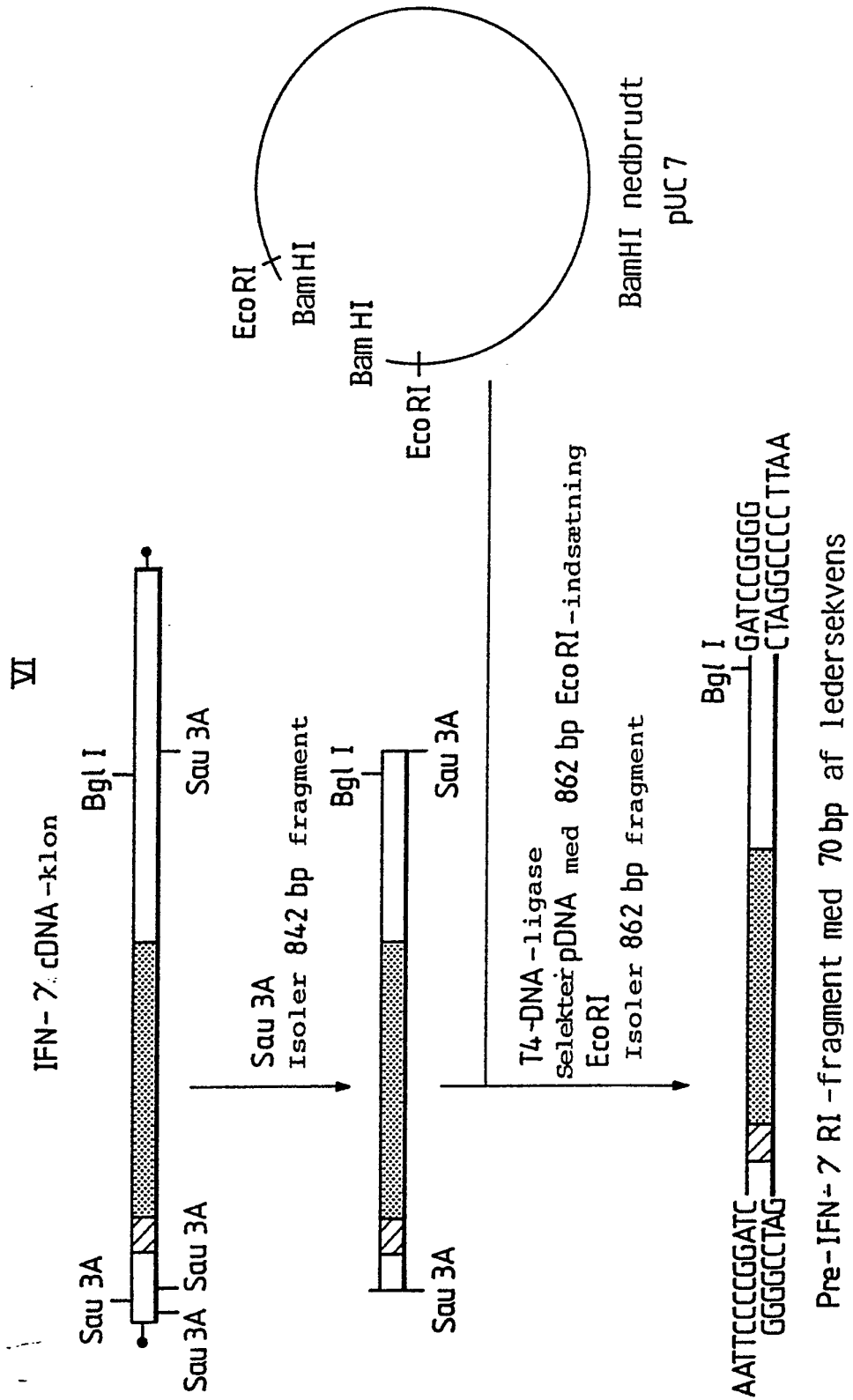


Fig.6.



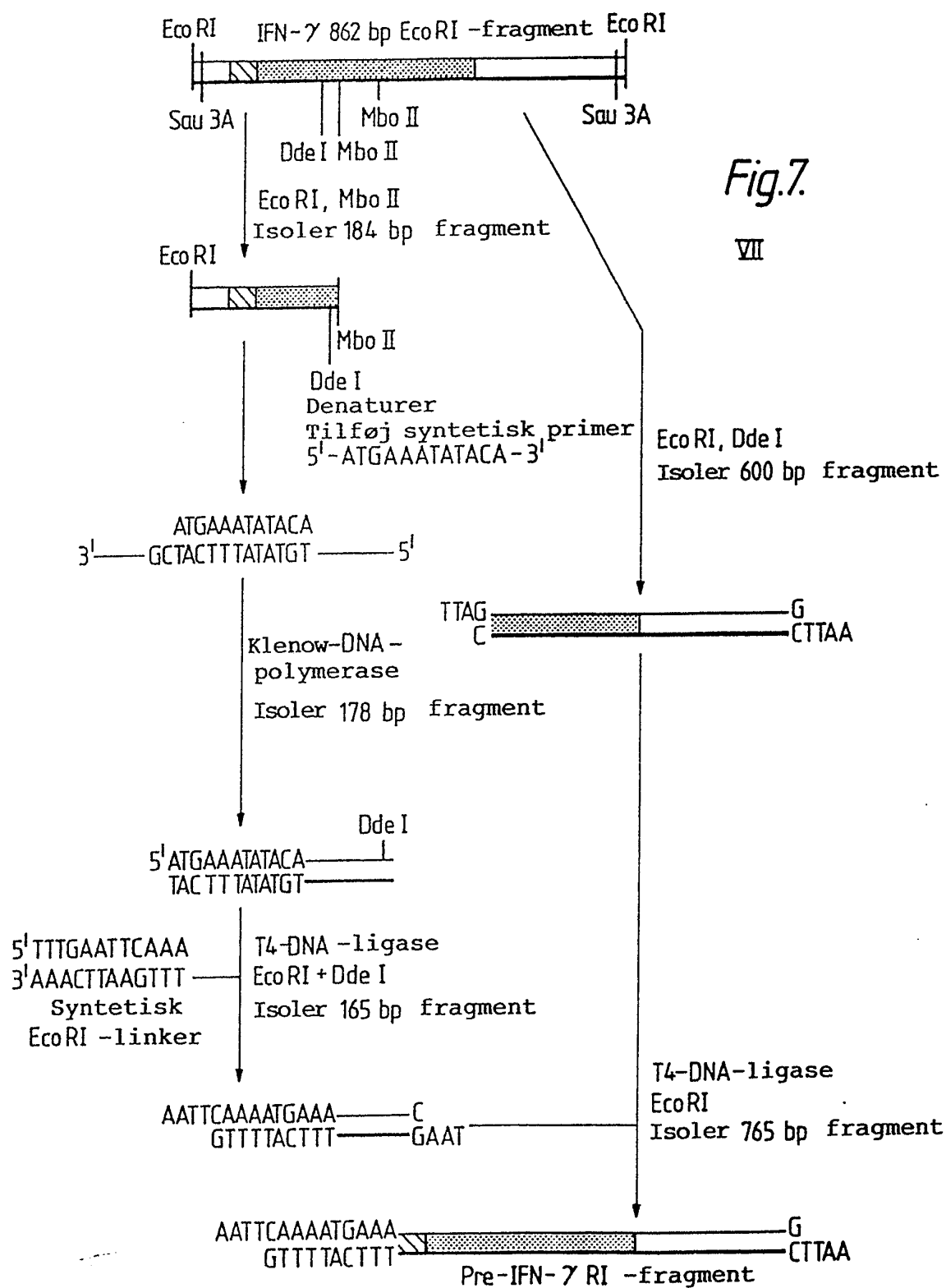
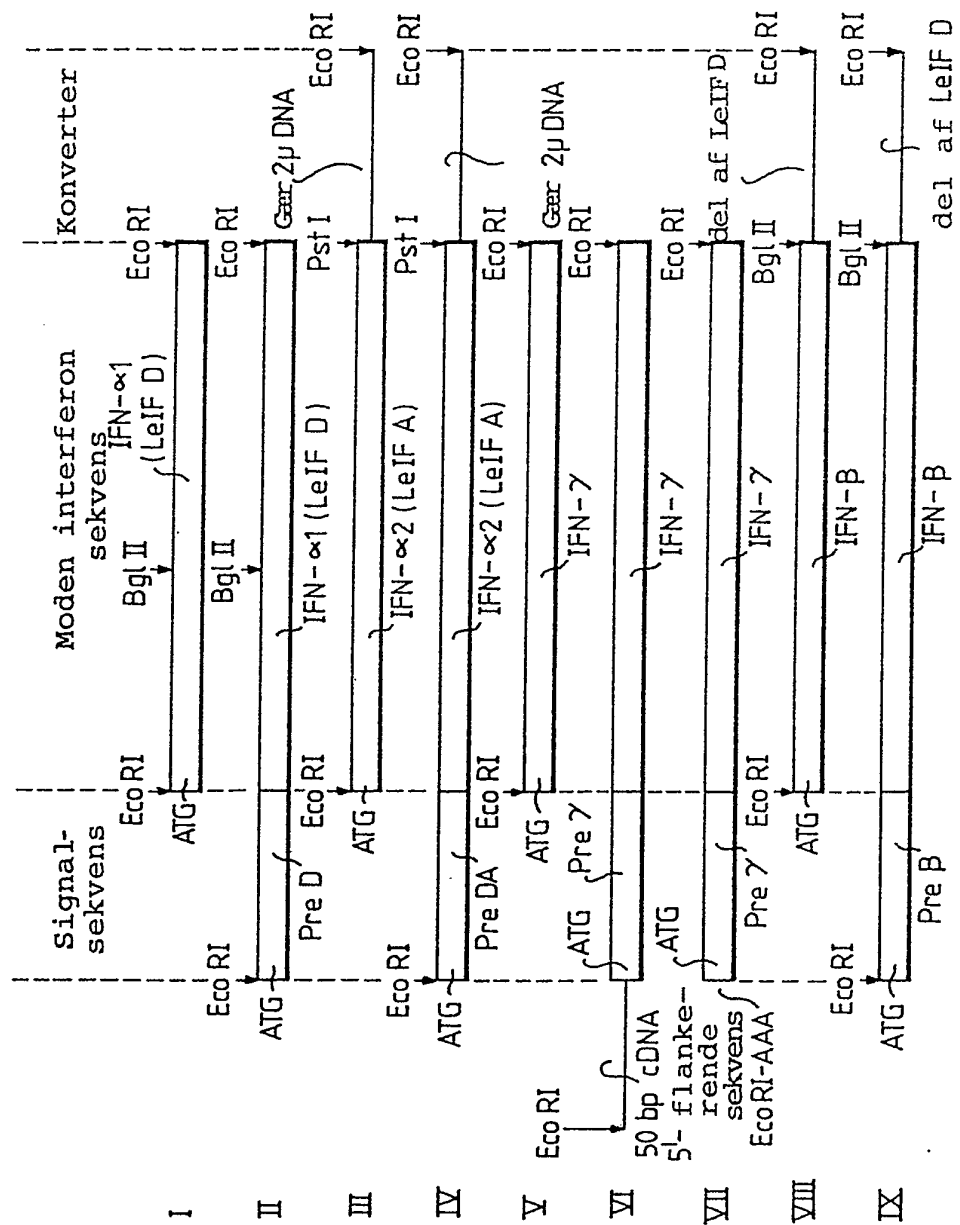


Fig.8.



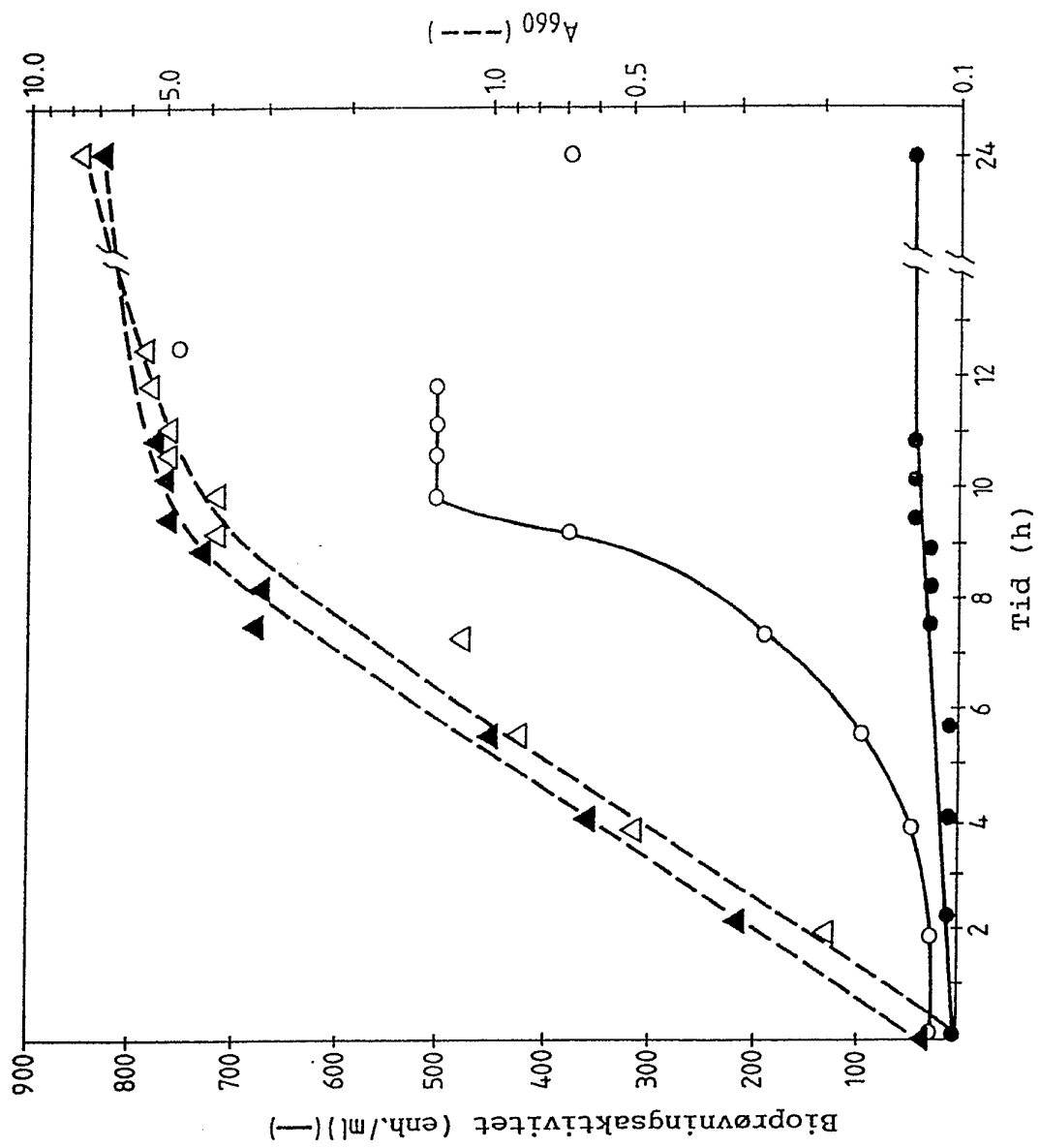


Fig. 10a.

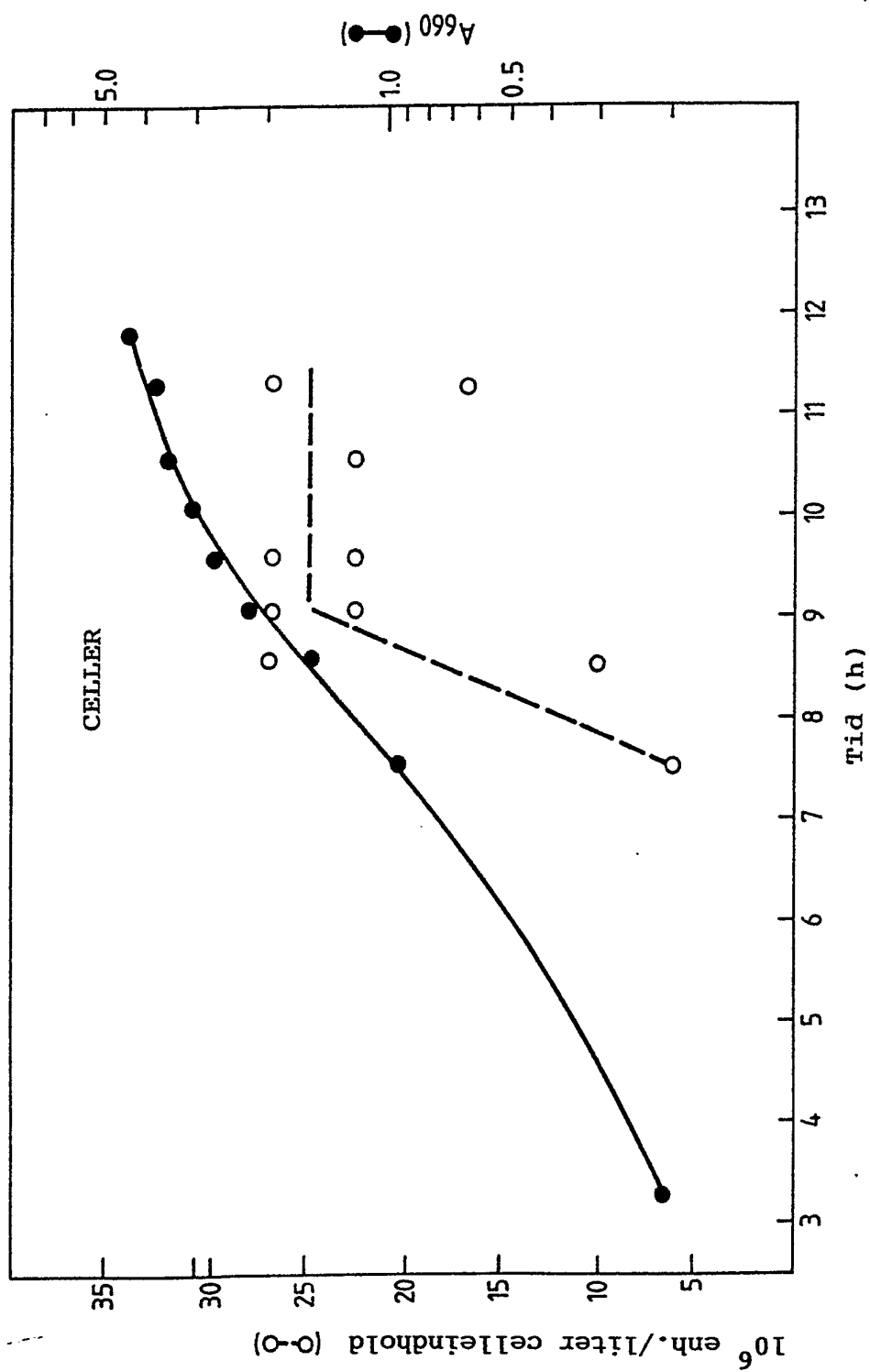


Fig. 10b.

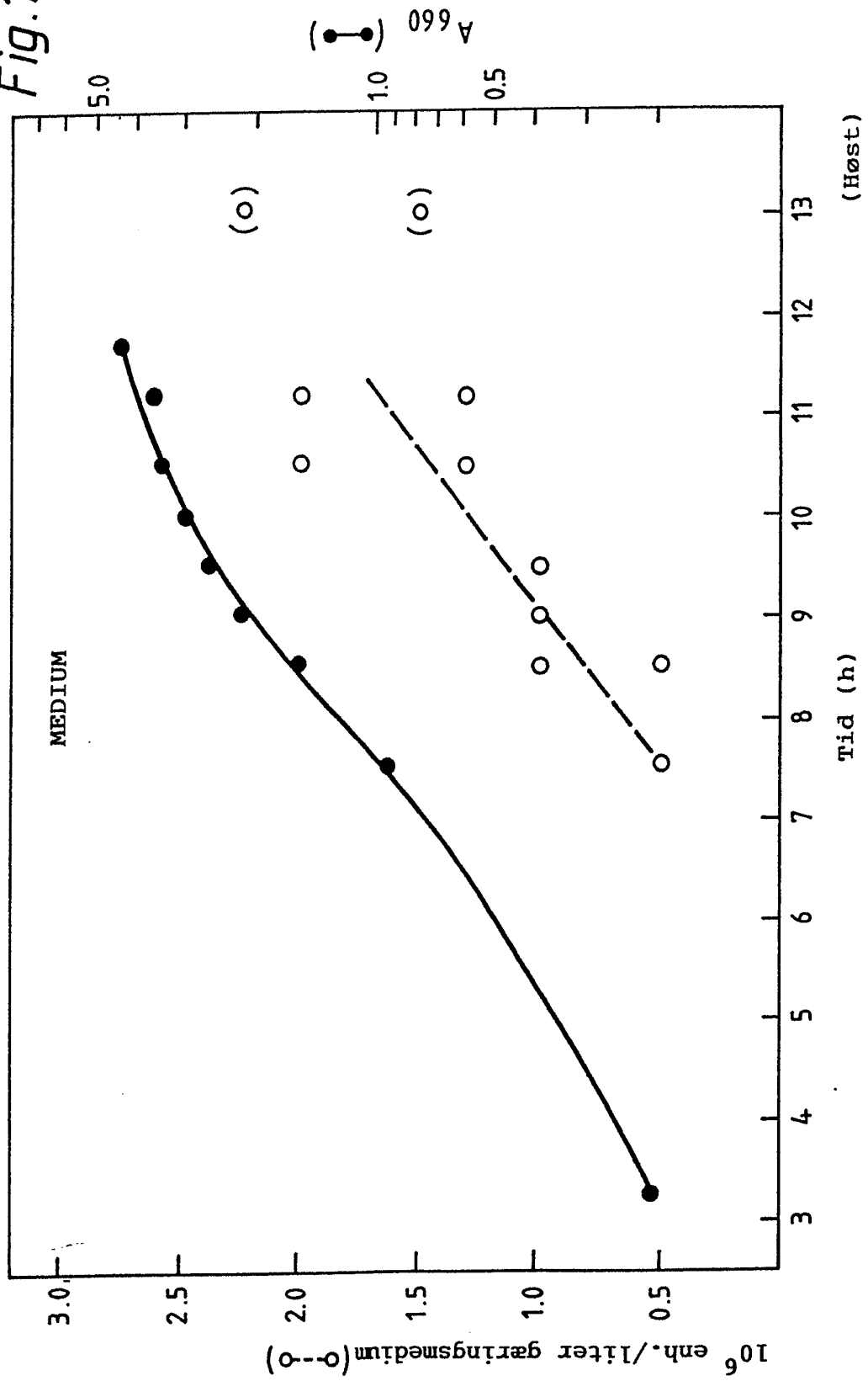


Fig. 11.

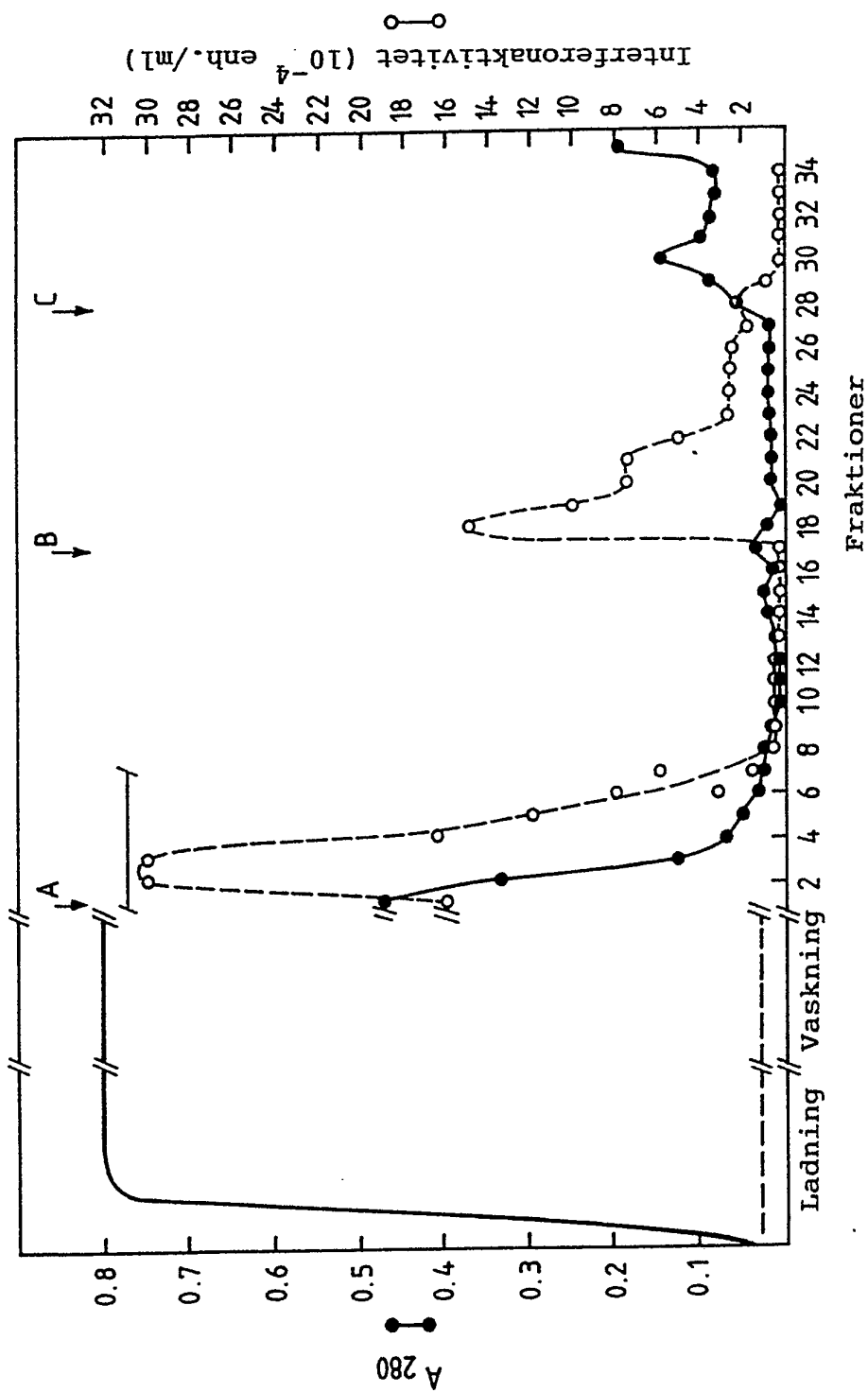
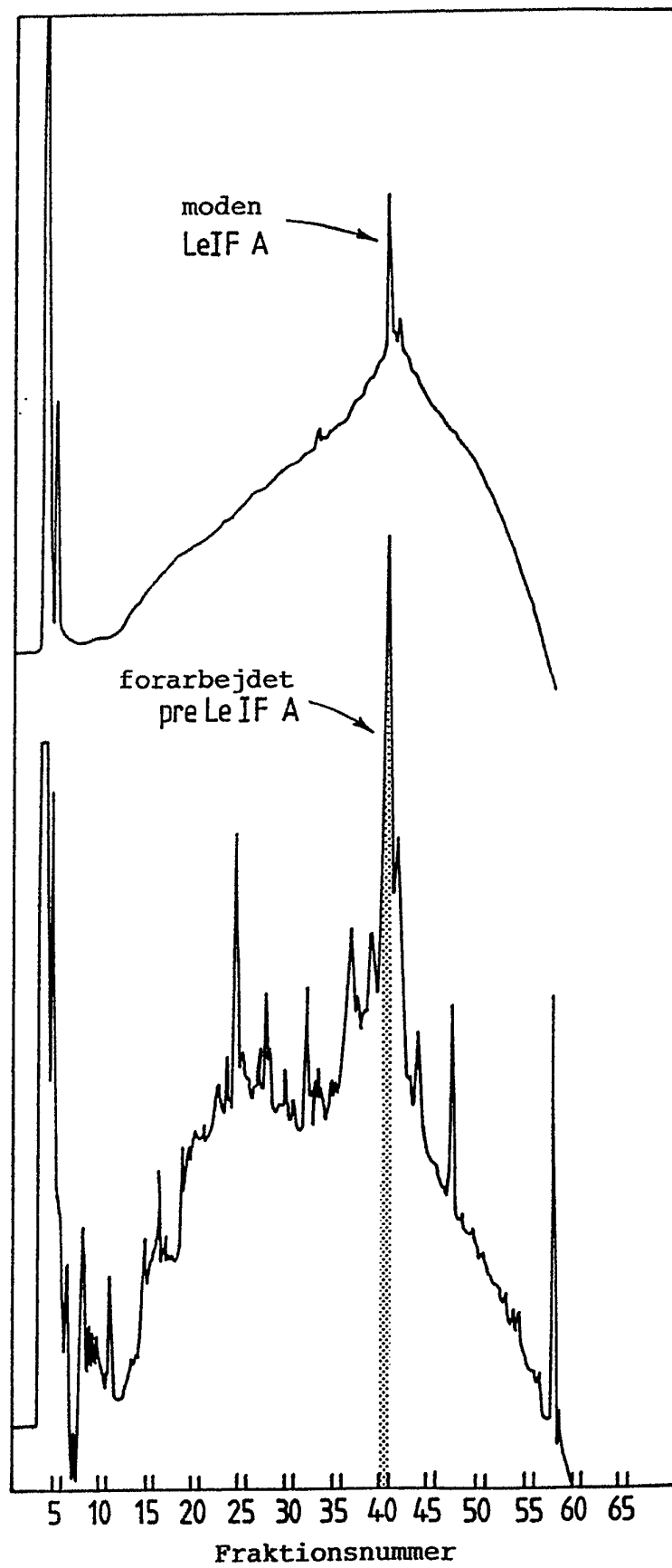


Fig. 12.

A 210



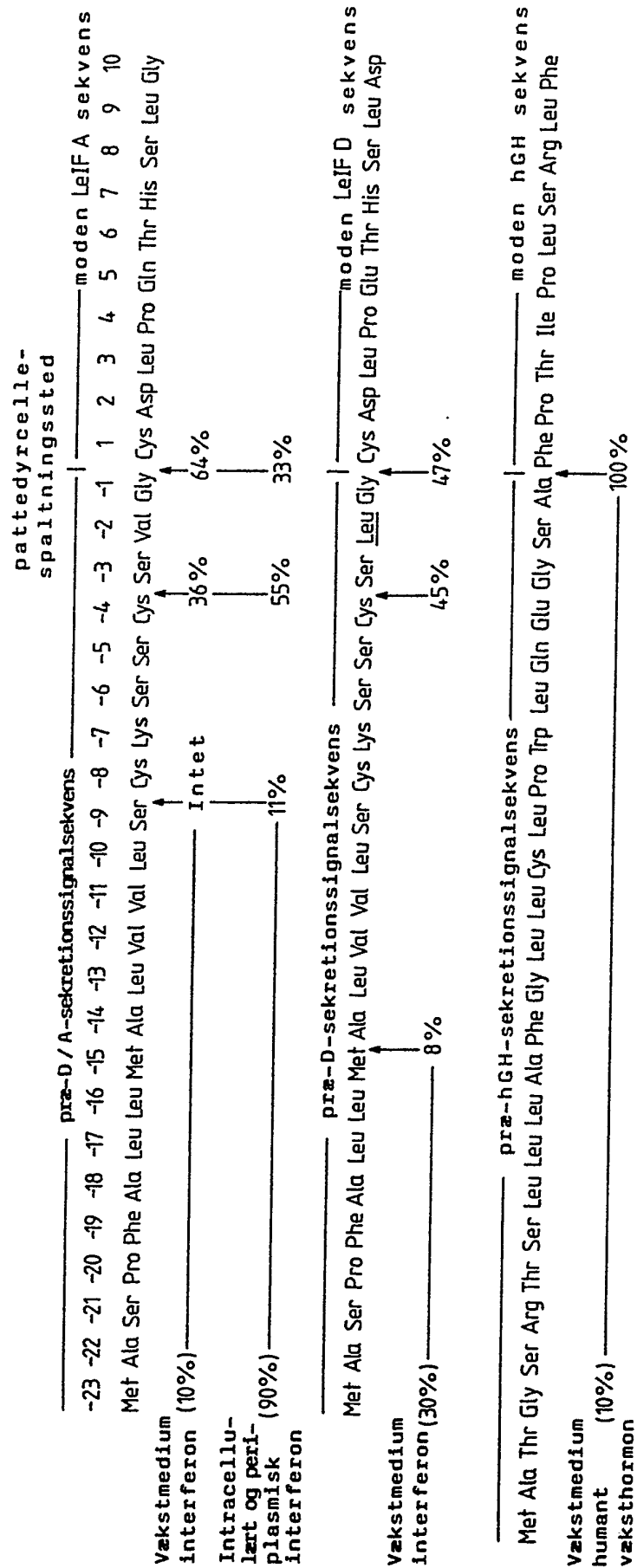


Fig. 14.

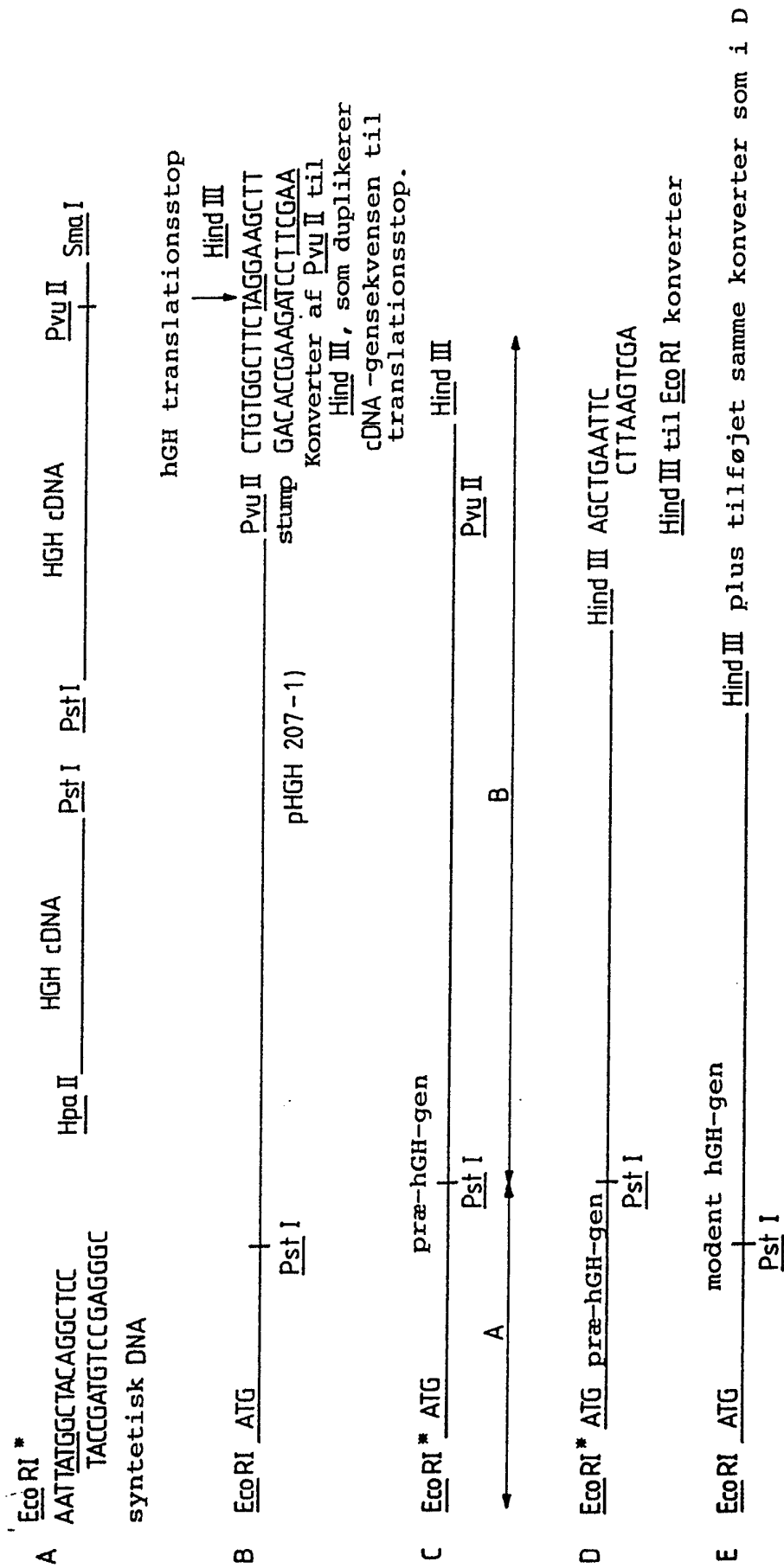


FIG. 15

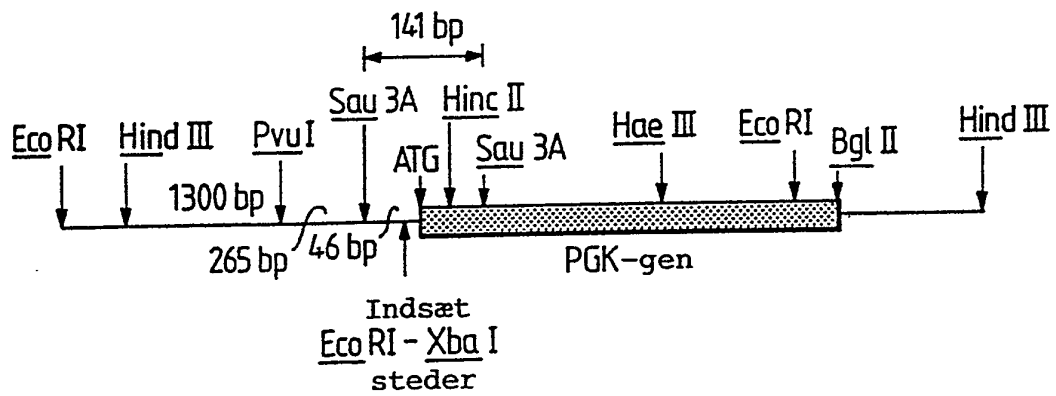


FIG.16

5'-----⁻⁴⁰GATCATAAGGAAGTAAT⁻³⁰TATCTACTTTT⁻²⁰TACAAACAATAATAAAACA⁻¹⁰⁻¹MET SER LEU SER SER LYS LEU LEU VAL
ATG TCT TTA TCT TCA AAG TTG CTC GTC

FIG. 17

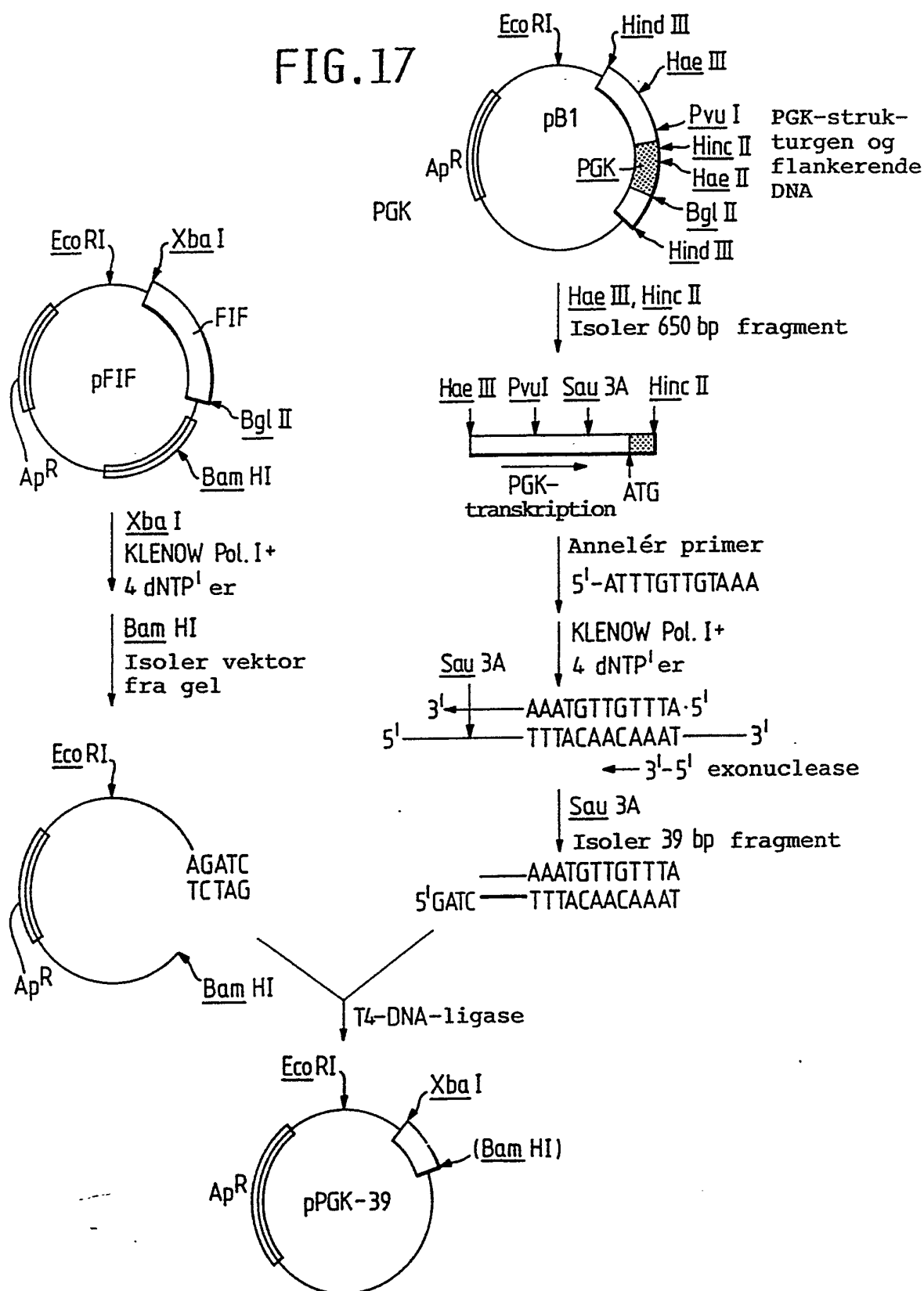


FIG. 18

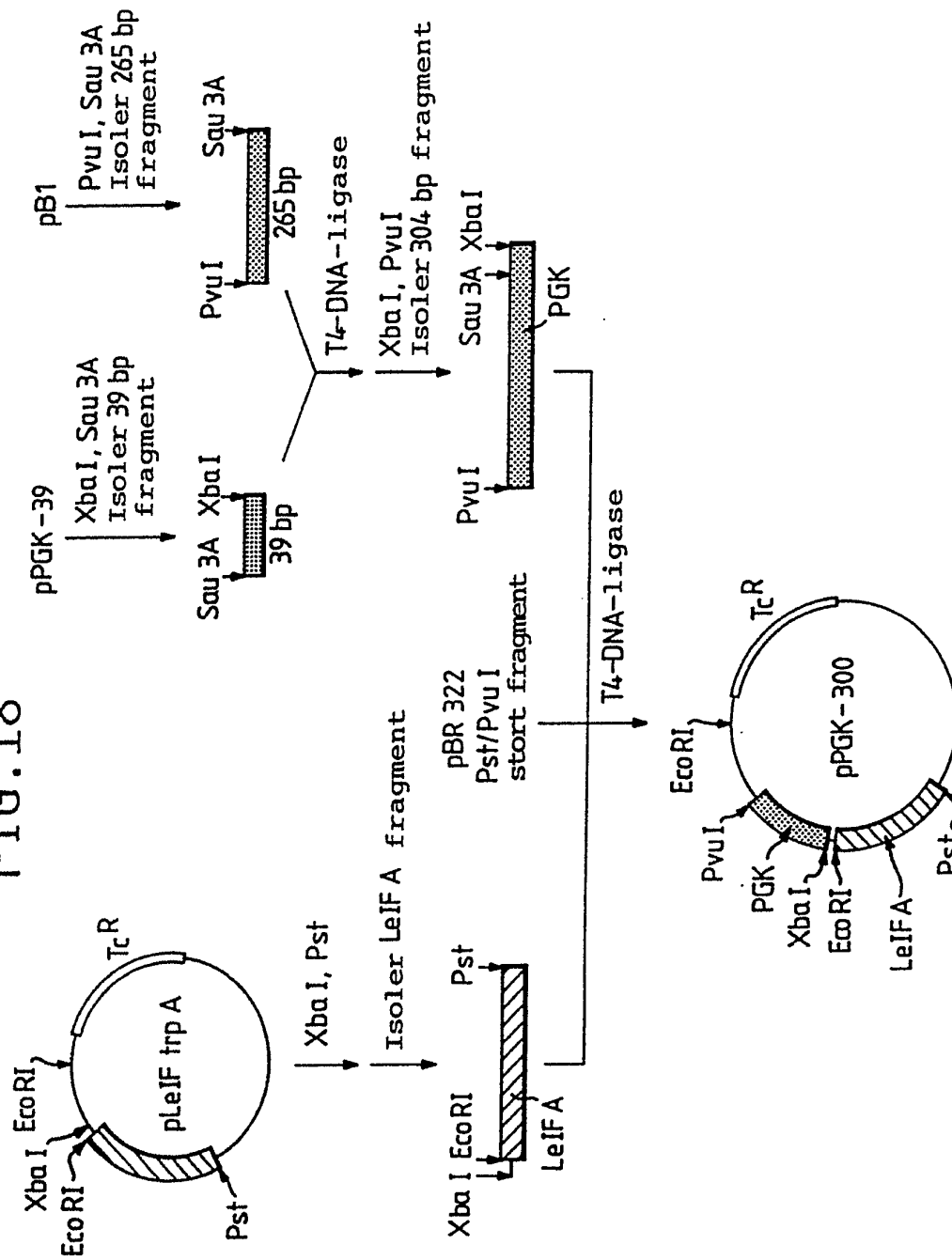


FIG. 19

