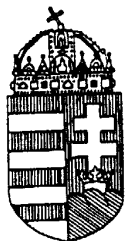


(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG
ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám

202287 B

(22) Bejelentés napja: 1982. 10. 18. (21) (3305/82)

Bejelentés elsőbbsége: (33) 1981. 10. 19.
(32) US
(31) 312,489

(83) Figyelembe vett nyomtatványok:
ATCC 27325
ATCC 31537
ATCC 33588
ATCC 31446

(40) Közzététel napja: 1984. 04. 30.

(45) Megadás meghirdetésének dátuma
a Szabadalmi Közlönyben: 1991. 02. 28.

(51)

NSZO₅
C12P 21/02
C12N 15/23

(72) Feltaláló(k):
van GOEDEL David Norman Hillsborough
GRAY Patrick William San Francisco
Kalifornia, US

(73) Szabadalmas:
Genentech Inc., South
San Francisco, Kalifornia, US

(74) Képviselő:
Budapesti 29. sz. ÜMK

(54) ELJÁRÁS HUMÁN IMMUN INTERFERON ÉS EZT TARTALMAZÓ GYÓGYSZERKÉSZÍTMÉNYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány eljárás egy új, lényegileg tiszta polipeptid, a humán gamma- vagy immun-interferon előállítására a rekombináns DNS-módszer alkalmazásával, oly módon, hogy emberi szövetből mRNS-t nyernek ki vagy ilyet szintetizálnak, az mRNS-ből cDNS könyvtárat készítenek, ezt megfelelő plazmidba iktatva, és ezt a plazmidot valamely alkalmas baktériumba, előnyösen E. coliba transzformálva transzformánsokat készítenek, a transzformánsokat radioaktív vizsgáló mintával (szondával) átvizsgálják, a hibridizáló telepekből plazmidokat készítenek, ezek cDNS-ének szerkezetét megvizsgálják, az immun-interferon tulajdonságainak megfelelő polipeptidet kódoló cDNS-t magában foglaló plazmidot kiválasztják, ebből a humán immun-interferont kódoló DNS-szakaszt elkülönítik és megfelelő szabályozó rendszerrel rendelkező vektorba iktatják, a vektort megfelelő baktériumtörzsbe, élesztőtörzsbe vagy állati szövettenyészetbe transzformálják, a transzformánsokat megfelelő tápközegben tenyésztik, és a tenyészetből a humán immun interferont kinyerik.

A leírás terjedelme: 36 oldal, 16 ábra

HU 202287 B

A találmány a rekombináns DNS technológia területére vonatkozik; tárgyát a humán immuninterferon DNS-szekvenciának és levezetett aminosav-szekvenciájának felderítésére alkalmas technológiai eszközök és módszerek, valamint azoknak a humán immuninterferon előállítására való alkalmazása képezi.

Közelebbről megjelölve, a találmány a humán immuninterferont kódoló DNS-szekvenciák elkülönítésére és azonosítására, valamint ilyen DNS-szekvenciákat tartalmazó és az expressziót eszközölő promóter-szekvenciákhoz működőképesen kapcsolt rekombináns DNS expresszió-hordozók felépítésére és az így felépített expresszió-hordozókra vonatkozik. Vonatkozik másrészt a találmány az ilyen expresszió-hordozókkal transzformált és így a fent említett DNS-szekvenciák expressziójára irányított gazdasejt-kultúra rendszerekre, így például különféle ilymódon transzformált mikroorganizmus- és emlőszállat-sejtkultúrákra is. A találmány körébe tartozik továbbá az említett expresszió végtermékeinek átalakítása különféle új termékekkel, úgy mint emberek megelőző kezelésére és gyógykezelésére alkalmas gyógyszerkészítményekké. A találmány előnyös kiviteli alakjai olyan különleges expresszióhordozókra vonatkoznak, amelyek humán immun interferon termelésre és a gazdasejtből érett alakban történő kiválasztására képesek. A találmány körébe tartoznak végül az említett DNS-szekvenciák, expresszió-hordozók, sejtkultúra-rendszerek, végtermékek és az azokból képezett további termékek előállítására alkalmazott eljárások is.

A jelen találmány alapját elsősorban a humán immuninterferont kódoló DNS-szekvenciának és levezetett aminosav-szekvenciának a felismerése képezte. A találmányt megalapozó további felismerés a humán immuninterferon 3'- és 5'-szegélyező szekvenciájának felderítése volt, ami megkönnyítette annak in vitro bekapcsolását expresszió-hordozókba. Így előállítottuk a feltételezett endogén szignál-polipeptidet kódoló 5'-DNS-szekvenciát, amely közvetlenül megelőzi a feltételezett érett humán immuninterferont. Ezek a felismerések viszont lehetővé tették azoknak az eszközöknek és módszereknek a kifejlesztését, amelyekkel a rekombináns DNS-technológia útján annyi humán immuninterferont állítottunk elő, amennyi elegendő volt a termék biokémiai tulajdonságainak és bioaktivitásának a meghatározására.

A találmány háttérének megvilágítására, valamint az eljárás egyes lépéseinek leírása során további részletes adatokra vonatkozólag számos helyen utalunk a korábbi irodalomra; a szövegben zárójelben álló számok a leírás végén közölt bibliográfiára utalnak.

A találmány technikai háttere

A. Humán interferon

A humán interferonok különböző antigén hatásuk, valamint biológiai és biokémiai tulajdonságaik alapján három csoportba sorolhatók.

Az első csoportba a leukocita-interferonok családja (α -interferon, LeIF vagy IFN- α) tartozik; ezeket rendes körülmények között főként az emberi vért alkotó sejtek termelik, vírusok általi indukció hatására. Ezeket már előállították mikrobiológiai úton is és biológiaiul aktívnak találták őket (1, 2, 3). Biológiai tulajdonságaik alapján klinikailag is alkalmazták őket

vírusos fertőzések és rosszindulatú megbetegedések gyógykezelésére (4).

A második csoportba a humán fibroblaszt-interferon (β -interferon, FIF vagy IFN- β) tartozik, ezt rendes körülmények között a fibroblasztok termelik, vírusos indukció hatására; szintén előállították már mikrobiológiai úton és azt tapasztalták, hogy biológiai aktivitások széles körét fejtik ki (5). Klinikai kísérletek alapján gyógyászati felhasználás is lehetségesnek látszik. A leukocita- és a fibroblaszt-interferonok biológiai tulajdonságaik szempontjából igen határozott hasonlóságot mutatnak, annak a ténynek az ellenére, hogy aminosav-szintjük homológia-foka viszonylag alacsony. Emellett az e két csoportba tartozó interferonok egyaránt 165-166 aminosavat tartalmazó és savakkal szemben stabil fehérjék.

A harmadik csoportba sorolható és a jelen találmány tárgyát képező humán immuninterferon (IFN- γ) vagy más néven humán gamma-interferon az α - és β -interferonokkal ellentétben a pH 2-nél labilis; ezt az interferont limfociták termelik mitogén indukció hatására s antigén tulajdonságai szempontjából is határozottan eltér az előbbiektől. A humán immuninterferont egészen a legutóbbi időig csak igen kis mennyiségekben sikerült kimutatni és az a körülmény nyilvánvalóan gátolta közelebbi jellemzését. Legutóbb a humán immuninterferon eléggé messzemenő, de még mindig csak részleges tisztításról számoltak be (6). A közlés szerint a vegyületet fitohemagglutin és forbol-észter kombinációjával gerjesztett leukocitakultúrák termelték és sorozatos kromatográfiai elválasztásokkal tisztították a terméket. Ez az eljárás egy 58 000 molekulatömegű terméket eredményezett.

Igen kis mennyiségekben állítottak elő humán immuninterferont mRNS oocitákban történő transzlációja útján; ez a termék a humán immuninterferonra jellemző interferon-aktivitást mutatott és a szerző véleménye szerint remélhető, hogy az immuninterferon cDNS szintetizálható és klónoozható (7).

Az immuninterferon eddig előállított mennyiségei bizonyára nem elegendőek ahhoz, hogy egyértelmű eredményeket adó kísérleteket lehessen folytatni a tisztított termék jellemzésére és biológiai tulajdonságainak meghatározására. Azonban a nyers készítményekkel lefolytatott in vitro kísérletek, valamint az egér- γ -interferon készítményekkel folytatott in vivo kísérletek arra mutatnak, hogy az immuninterferon elsődlegesen valószínűleg immun-szabályozó szerként szerepel (8, 9). Az immuninterferonnak nem csak vírus-ellenes és anticelluláris aktivitása van (ami valamennyi humán interferon közös tulajdonsága), hanem fokozni is képes az α - és β -interferon ilyen irányú hatását (10). Emellett egyes közlések szerint a γ -interferon tumor-sejtekkel szembeni sejtziporodást gátló hatása körülbelül 10-100-szorosan nagyobb, mint az egyéb csoportokba tartozó interferonoké (8, 11, 12). Ezek a megállapítások, az immuninterferon határozott immun-szabályozó szerepével (8, 9) együtt arra mutatnak, hogy az IFN- γ sokkal határozottabb tumor-ellenes hatással rendelkezik, mint az IFN- α és IFN- β .

Valóban, az egér-IFN- γ készítményekkel in vivo folytatott kísérletek azt mutatták, hogy ennek az immuninterferonnak a hatása határozottan felülmúlja a vírus-ellenes indukált egyéb interferonok tumor-ellenes hatását oszteogén szarkóma ellen (13).

Mindezeket a kísérleteket a jelen találmányt megelőző időben meglehetősen nyers készítményekkel kellett lefolytatni az immuninterferon ilyen nehéz hozzáférhetősége miatt. Eredményeik azonban kétségtelenül az immuninterferon rendkívül fontos biológiai szerepére mutatnak. Az immuninterferonnak nem csak erős vírus-ellenes hatása van, hanem valószínűleg erős immun- szabályozó és tumor-ellenes hatása is, ami határozottan az immuninterferon eredményes klinikai alkalmazásának a lehetőségére mutat.

Úgy találtuk, hogy a rekombináns DNS-technológia alkalmazása látszik a leghatékonyabb módszernek a humán immuninterferon szükséges nagyobb mennyiségeknek az előállítására. Feltételeztük, hogy az így kapott termékek, akár glikozilezettek lesznek akár nem (a glikozilezettséget a natív, humán eredetű termék jellemző tulajdonságának tartják), minden esetben mutatni fognak olyan bioaktivitást, ami lehetővé teszi klinikai alkalmazásukat a vírusos, neoplasztikus és immun-szuppresszált állapotok és megbetegedések széles körében.

B. Rekombináns DNS-technológia

A rekombináns DNS-technológia ma már igen kifinomult módszerrel fejlődött. A molekuláris biológia kutatói már viszonylag könnyen tudnak különböző DNS-szekvenciákat rekombinálni, így új DNS-féleségeket hoznak létre, amelyek bőséges mennyiségben termelnek exogén fehérje-termékeket a transzformált mikroorganizmusokban. Rendelkezésre állnak az eszközök és módszerek különböző tompavégű vagy „ragadós” végű DNS-fragmensek in vitro kapcsolására és így hatékony expresszió-hordozókat állítanak elő, amelyek bizonyos mikroorganizmusok transzformálására használhatók és ezzel irányítani tudják a kívánt exogén termék szintézisét. Az egyedi termékek termelésére irányuló utak azonban még meglehetősen tekervényesek és így ez a tudomány még nem fejlődött olyan fokra, hogy a kívánt siker rendszeresen előre megjósolható legyen. Valójában azok, akik kísérleti megalapozás nélkül akarják adott esetben a módszer alkalmazásának sikeres eredményét előre megjósolni, ezt csak a sikertelen gyakorlati alkalmazás kockázatával tehetik.

A plazmid, ez a kettős-szálú DNS nem-kromoszóma hurok-képződménye, amely a baktériumokban és egyéb mikroorganizmusokban, sejtenként gyakran többszörös másolatban is található, továbbra is a rekombináns DNS-technológia alapvető eleme marad. A plazmid-DNS-ben kódolt információ magába foglalja a plazmidnak a leány-sejtekben történő reprodukálásához szükséges információt (vagyis a replikáció eredetét) is, valamint rendszerint egy vagy több fenotípusos szelekciós jellemzőt, mint például baktériumok esetében az antibiotikumokkal szembeni rezisztenciát, ami lehetővé teszi a kérdéses plazmidot tartalmazó gazdasejt klónjainak felismerését és szelektív közegekben történő kedvezőbb szaporítását. A plazmidok hasznossága abból a tényből ered, hogy ezek a plazmidok az egyik vagy másik resztrikciós endonukleáz vagy „resztrikciós enzim” segítségével specifikusan hasíthatók, mert ezeknek az enzimeknek mindegyike más és más helyet „ismer fel” a plazmid-DNS-en. Ezt követően heterológ gének vagy gén-fragmensek illeszthetők be a plazmidba, e frag-

mensek végeinek a hasítási helynél vagy a hasítási hellyel szomszédos rekonstruált végeknél történő kapcsolása útján. Így képezik az úgynevezett replikálható expresszió-hordozókat. A DNS-rekombináció a sejten kívül megy végbe, de a keletkező „rekombináns” replikálható expresszió-hordozó vagy plazmid a „transzformáció” néven ismert eljárással bevihető a sejtekbe és a transzformáns tenyésztése útján a rekombináns hordozó nagy mennyigei nyerhetők. Emellett, ha a gén beillesztése a plazmidnak bekódolt DNS-üzenet transzkripcióját és translációját irányító részeihez viszonyítva helyesen történt akkor az így kapott expresszió-hordozó felhasználható a beillesztett gén által kódolt polipeptid-szekvencia tényleges termelésére; ezt az eljárást nevezik expresszióknak.

Az expresszió a „promoter” néven ismert és az RNS-polimeráz által felismert és kötött tartományban kezdődik. Az expresszió transzkripció fázisában a DNS kitekeredik és hozzáférhetővé teszi az említett DNS-szekvenciából származó tartományt templátként a „messenger”-RNS iniciált szintézise számára. A messenger-RNS viszont az általa kódolt aminosav-szekvenciájú polipeptiddé translálódik. Minden egyes aminosavat egy-egy nukleotid-triplett vagy „kodon” kódol, ezek a kodonok együttesen képezik a „szerkezeti gént”, vagyis azt a részt, amely kifejezett polipeptid-termék aminosav-szekvenciáját kódolja. A transláció egy „start”-szignálnál kezdődik (ez rendszerint ATG, amelyből a képződő messenger-RNS-ben AUG lesz).

A transláció és egyúttal az aminosav képződés végét úgynevezett „stop”-kodon határozza meg. Az így keletkezett termék mikrobiális rendszerek esetében, ha szükséges, a gazdasejt lízise és a terméknek a jelenlevő egyéb fehérjéktől való elkülönítésére alkalmas tisztítási műveletek útján nyerhető ki.

A gyakorlatban a rekombináns DNS-technológia útján teljesen heterológ polipeptidek expressziója – úgynevezett „direkt expresszió” – vagy pedig egy homológ peptid aminosav-szekvenciájának egy részéhez kötött heterológ peptid expressziója válik lehetségessé. Ez utóbbi esetekben az előállítani kívánt bioaktív termék olykor bioinaktívvá válik az összekepcolt homológ/heterológ polipeptidben és csak akkor lesz aktív, ha valamely sejtben kívüli környezetben lehasítják; vö.: 2 007 676 A sz. brit szabadalmi közrebocsátási irat, továbbá Wetzler; American Scientist 68, 664 (1980).

C. Sejtkultúra-technológia

A sejt- vagy szövetkultúráknak a genetikai és sejtfiziológiai tanulmányok céljaira történő tenyésztési módszerei jól ismertek. Rendelkezésre állnak az eszközök és módszerek az elkülönített normális sejtekből folytatólagos sorozatos átvitelek útján előállított permanens sejtvonalak fenntartására. Az ilyen sejtvonalak kutatási célokra való fenntartása folyékony közegekben tartott szilárd hordozón, vagy pedig a fenntartó tápanyagokat tartalmazó szuszpenzióban való tenyésztéssel történik. Úgy látszik, hogy a nagyméretben történő termelés céljaira való felnagyításhoz már csak mechanikai problémák merülnek fel. Az eddigi ismeretek további részleteire vonatkozólag utalunk a következő irodalomra: Microbiology, 2. kiad., Harper and Row Publishers Inc., Hagerstown, Maryland

(1973). Különösen az 1122 és köv. old., valamint Scientific American 245, 66. és köv. old. (1981).

A találmány összefoglalása

A jelen találmány azon a felismerésen alapul, hogy a rekombináns DNS-technológia sikeresen alkalmazható humán immuninterferon előnyösen közvetlen alakban és piacon való forgalmazás feltételül szolgáló állatkísérletek és klinikai kísérletek elvégzéséhez és lefolytatásához elegendő mennyiségekben történő előállítására. A termék valamennyi alakjában alkalmazható embereknél vírusos fertőzések, malignus és immun-szuppressziós vagy immun-hiányos állapotok megelőző vagy gyógyászati kezelésére. A termék említett alakjai sorába különféle lehetséges oligomer, esetleg glikozilezett alakok tartoznak. A terméket genetikailag átalakított transzformáns mikroorganizmusok vagy sejt kultúrák termelik. Így a találmány szerinti eljárással a humán immuninterferon az ediginél hatékonyabb módon termelhető és nyerhető ki. A találmány előnyös kiviteli alakjának egyik jelentős vonása, hogy ezzel az eljárással a mikroorganizmusok vagy sejt kultúrák genetikailag irányíthatók arra, hogy humán immuninterferont izolálható mennyiségekben termeljenek és az érett alakban válasszák ki a gazdasejtéből.

A találmány tárgya tehát elsősorban a humán immuninterferon előállítására szolgáló eljárás, amelynek részleteit az alábbiakban ismertetjük. A találmány körébe tartoznak továbbá a humán immuninterferont kódoló gén-szekvenciákat kifejezhető alakban magukban foglaló replikálható DNS expresszió-hordozók, valamint az említett expresszió-hordozókkal transzformált és humán immuninterferon termelésére képes mikroorganizmus-törzsek és sejt kultúrák, úgyszintén az ilyen immuninterferon génszekvenciák, DNS expresszió-hordozók, mikroorganizmus-törzsek és sejt kultúrák előállítására alkalmas különféle eljárások és azok specifikus kiviteli alakjai is. Vonatkozik továbbá a találmány az említett mikroorganizmusok és sejt kultúrák fermentációjára alkalmas kultúráinak előállítására, valamint humán immuninterferonnak a kultúrák gazdasejtjeiből érett alakban kiválasztott közvetlen expressziós termékként történő előállítására is. Ebben az eljárásban az érett szekvenciáját kódoló gén és a szignál-poli-peptidet kódoló 5'-oldallánc-DNS kerülhet alkalmazásra. A szignál-poli-peptid feltehetően elősegíti a molekulának a gazdaszervezet sejt falához való vitelét, majd ott hasad le az érett humán immuninterferon termék kiválasztási folyamata alatt. Ily módon lehetővé válik a kívánt humán immuninterferon elkülönítése és tisztítása anélkül, hogy külön műveleteket kellene alkalmazni a gazdasejt intracelluláris fehérjéiből és sejt-törmelékekből álló szennyezések eltávolítására.

Az „érett humán immuninterferon” kifejezésen e leírásban a mikroorganizmusok vagy sejt kultúrák által termelt olyan humán immuninterferont értünk, amelyhez nem kapcsolódik a humán immuninterferon-mRNS transzlációját közvetlenül elősegítő szignál-peptid vagy előszekvencia-peptid. Így a jelen találmány szerinti eljárással előállított első rekombináns humán immuninterferon metionint tartalmaz első aminosavként (amely az ATG start-szignál kodonnak a szerkezeti gén elé történt beillesztése következtében

került oda), vagy ha a metionin intra- vagy extracellulárisan lehasadt, akkor a rendes körülmények között első aminosavként szereplő cisztein áll ezen a helyen. Az érett humán immuninterferon – összhangban a fentiekkel – előállítható valamely, a szokásos szignál-peptidtól különböző konjugált peptiddel együtt is; a konjugátum azután specifikusan lehasítható intra- vagy extracelluláris környezetben (vö.: 2 007 676 sz. brit szabadalmi közrebocsátási irat. Végül, előállítható az érett humán immuninterferon közvetlen expresszió útján is, anélkül, hogy bármilyen fölösleges kísérő polipeptidet kellene a termékről lehasítani. Ez különösen olyan esetekben fontos, amikor valamely adott gazdaszervezet nem képes eltávolítani a szignál-peptidet, az expresszió-hordozó viszont úgy van megalkotva, hogy az érett humán immuninterferont szignál-peptidjével együtt.

Az így termelt érett humán immuninterferont azután elkülönítjük és olyan mértékben tisztítjuk, hogy a kapott termék alkalmas legyen vírusos fertőzések, malignu, immun-szuppresszív vagy immun-hiányos állapotok gyógykezelésére.

A humán immuninterferon előállítása az alábbi módon történt:

1. Emberi szöveteket, például emberilepesszöveteket vagy perifériális vérlimfocitákat mitogén anyagok jelenlétében tenyésztünk, az immuninterferon termelésének serkentése céljából.

2. Az ilyen sejt kultúrákból kapott sejt pasztillákat ribonukleáz-inhibitor jelenlétében extraháljuk, az összes citoplazmás RNS elkülönítése céljából.

3. Egy oligo-dT oszlopon elkülönítettük az összes messenger-RNS-t (mRNS) poliadenilezett alakban. Ezt az mRNS-t méret szerint frakcionáltuk, szacharóz-sűrűség-grádiens és savas karbamid gélelektroforézis alkalmazásával.

4. Az alkalmas mRNS-frakciót (12–18 S) a megfelelő egyszálú komplementer DNS-sé (cDNS) alakítottuk át, majd ebből kettőszálú cDNS-t képeztünk. Poli-dC végrész-képzés után ezt egy vektorba, például valamely egy vagy több fenotípusos jelzőt (marker) hordozó plazmidba illesztettük be.

5. Az így készített vektorokat használtuk fel azután a baktérium-sejtek transzformálására és így egy kolónia-„könyvtárát” képeztünk. A fent leírt módon kapott indukált és indukálatlan mRNS-ből egyaránt radioaktívan jelzett cDNS-t állítottunk elő és ezt használtuk fel a duplikátum kolónia-„könyvtárak” külön-külön történő vizsgálatára. A cDNS feleslegét ezután eltávolítottuk és a kolóniákat röntgen filmre helyeztük az indukált cDNS-klónok azonosítása céljából.

6. Az indukált cDNS-klónokból elkülönítettük a megfelelő plazmid-DNS-t és szekvenáltuk.

7. A szekvenált DNS-t azután in vitro megfelelően elakítottuk egy alkalmas expresszió-hordozóba való beillesztésre, amelyet egy alkalmas gazdasejt transzformálására használtuk fel; ezt a gazdasejtet egy E. coli kultúrában szaporítottuk és hagytuk, hogy az kifejezze a kívánt humán interferon terméket.

8. A kifejezett humán immuninterferon érett alakjában kétszázötvennél 146 aminosavat tartalmaz, ciszteintől kezdődően, és igen bázisos jellegű. A monomer számított molekulatömege 17 140. A molekula talán

a számos aminosav jelenléte, a hidrofóbság, a só-hídképzés stb. következtében oligomer-alakokba, tehát például dimer-, trimer- vagy tetramer-alakban asszociálódhat. A természetes anyag esetében korábban megfigyelt nagy molekulatömeg (6), amelyek nem magyarázhatók meg csupán az aminosav-szekvencia alapján, valószínűleg az ilyen oligomer-alakoknak, valamint a transzláció utáni glikozileződésből származó szénhidrát jelenlétének tulajdoníthatók.

9. Bizonyos gazdasejt-rendszerekben a humán immuninterferon, különösen ha az egy expressziós hordozóba van kötve és a 20 aminosavat tartalmazó szignál-peptidjével együtt kerül expresszióra, érett alakban kiválasztódik a sejt kultúra közegébe, ami rendkívüli módon megkönnyíti a humán immuninterferon kinyerési és tisztítási módszereit.

A találmány előnyös kiviteli alakjainak leírása

A. Mikroorganizmusok/sejtkultúrák

1. Baktérium-törzsek/promoterek

Az alábbiakban leírt munka során mikroorganizmusként többek között a 2 055 382 A sz. brit szabadalmi közrebocsátási iratban ismertetett *E. coli* K-12 294 törzset (vég A, *thi*⁻, *hsr*⁻, *ghsm*⁺) alkalmaztuk. Ezt a törzset az American Type Culture Collection gyűjteményében ATCC 31446 sz. alatt helyeztük letétbe. Felhasználhatók azonban a leírt eljárásban adott esetben más mikroorganizmus-törzsek is, mint például az ismert *E. coli* B, *E. coli* X 1776 (ATCC 31537), *E. coli* W 3110 (*F*⁻, *λ*⁻, protrof) (ATCC 27325), valamint más, legnagyobb részt különböző elismert mikroorganizmus-gyűjteményekben letétbe helyezett és onnan adott esetben beszerezhető mikroorganizmus-törzsek; vö.: például az American Type Culture Collection (ATCC) törzs-katalógusát, valamint a 2 644 432 sz. német szövetségi köztársasági szabadalmi közrebocsátási iratot. Az ilyen mikroorganizmusok további példáiként *Bacillus*-fajok, mint a *Bacillus subtilis* és más enterobaktériumok, mint *Salmonella typhimurium* és *Serratia marcescens* említhetők; mindezekhez olyan plazmidok alkalmazhatók, amelyek képesek a bennük történő replikációra és heterológ génszekvenciák expressziójára.

Ezek példáiként megemlítjük a béta-laktamáz és laktóz promotar-rendszereket, amelyeket már előnyösen alkalmaztak heterológ polipeptidek mikrobiológiai termelésének iniciálására és fenntartására. Az ilyen promotar-rendszerek kialakítására vonatkozólag vö.: Chang és munkatársai: *Nature* 275, 617 (1978), valamint Itakura és munkatársai: *Science* 198, 1056 (1977). Újabb egy triptofán-alapú rendszert is kifejlesztettek; ennek a *trp* promotar-rendszer néven ismert rendszernek a kialakítására és szerkezetére vonatkozólag Goeddel és munkatársai: *Nucleic Acid Research* 8, 4057 (1980), valamint Kleid és munkatársai az 1980. március 24-én bejelentett 133 296 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés leírása tartalmaznak további részleteket. Találtak és alkalmaztak számos másfajta mikrobiális promotert is; ezeknek a nukleotid-szekvenciájára vonatkozólag Siebenlist és munkatársai [*Cell* 20, 269 (1980)] ismertetnek részletes adatokat, amelyek a szakember számára elegendő kitanítást tartalmaznak ahhoz, hogy ezeket a promotereket funkcionálisan kapcsolhassák plazmid-vektorokba.

2. Élesztő-törzsek/élesztő promoterek

Ezeknek az expressziós rendszere is képes hasznosítani az YRp7 plazmidot (14, 15, 16), amely mind *E. coli* sejtekben, mind pedig a *Saccharomyces cerevisiae* élesztősejtekben képes szelekcióra és replikációra. Az élesztőben való szelekcióhoz a plazmid a TRP1 gént (14, 15, 16) tartalmazza, amely kiegészíti (triptofán távollétében lehetővé teszi) az élesztő IV kromoszómájában talált gének mutációit (17). Ennél a műveletnél az RH218 törzset (18) alkalmaztuk. (Letétbe helyezve korlátozás nélkül az American Type Culture Collection gyűjteményében ATCC 44076 sz. alatt.) Megjegyzendő azonban, hogy bármely *trp1* sejtet eredményező mutációt tartalmazó *Saccharomyces cerevisiae* törzs alkalmas környezetül szolgálhat az expresszió-rendszert tartalmazó plazmid expressziójához. A felhasználható egyéb törzsek példaként a pep4-1 törzset (19) említjük. Ez a triptofán-auxotrof törzs szintén tartalmaz egy pont-mutációt a TRP1 génben.

Az élesztő-génből származó 5'-szegélyező DNS-szekvencia (promoter), ha valamely nem-élesztő gén 5'-oldalára helyezzük, elő képes segíteni valamely idegen génnek az élesztőben történő expresszióját, ha ezt a promotert az élesztő transzformálására alkalmazott plazmidba visszük. A nem-élesztő génnek az élesztőben való helyes expressziójához a promoter mellett szükség van egy második, a plazmidon a nem-élesztő gén 3'-végéhez illesztett élesztő-szekvenciára is, amely így lehetőséget nyújt a megfelelő transzkripció-terminációra és poliadenilezésre az élesztőben. Ez a promoter megfelelően alkalmazható a jelen találmány szerinti eljárásban, de jól alkalmazhatók más megfelelő promoterek is (lásd alább). A találmány szerinti eljárás előnyös kiviteli alakja esetében az élesztő 3-foszfoglicerát-kináz-génjének 5'-szegélyező szekvenciáját a szerkezeti gén előtti helyre iktatjuk be, majd ezt ismét terminációs-poliadenilezési szignálokat tartalmazó DNS, például TRP1 gén (14, 15, 16) vagy PGK-gén (20) követi.

Míthogy az élesztő 5'-szegélyező szekvenciája (3'-terminációs élesztő-DNS-sel kapcsolatban lásd alább) elősegítheti idegen gének expresszióját az élesztőben, valószínűnek látszik, hogy bármely nagy mértékben kifejezett élesztő-gén 5'-szegélyező szekvenciái felhasználhatók fontos gén-termékek expressziójára. Míthogy bizonyos körülmények között az élesztő 65%-ig fejezte ki oldható fehérjét mint glikolitikus enzimet (21) és míthogy ez a magas expressziós szint láthatólag az egyedi mRNS-ek termelésének magas szintjéből (22) ered, feltehetőleg bármely más glikolitikus gén 5'-szegélyező szekvenciái felhasználhatók ilyen expressziós célokra; így az enoláz, gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz, hexokináz, piruvát-dekarboxiláz, foszfofruktokináz, glükóz-6-foszfát-izomeráz, 3-foszfoglicerát-mutáz, piruvát-kináz, triózfoszfát-izomeráz, foszfo-glükóz-izomeráz és glükokináz egyaránt alkalmazhatóknak látszanak erre a célra. E gének 3'-szegélyező szekvenciáinak bármelyike ugyancsak alkalmazható lehet a helyes befejezésre és mRNS-poliadenilezésre az ilyen expressziós rendszerben (lásd fentebb). Más alkalmas nagy expresszió-fokú génekként a savas foszfátázok génjei (23), valamint azok a gének említhetők, amelyeknél az expresszió magas szintje az 5'-szegélyező

tartományokban fellépő mutációknak tulajdonítható (az expressziót növelő mutánsok), ami rendszerint egy TY1 transzponálható elem jelenlétének a következménye (24).

Úgy véljük, hogy valamennyi fent említett gént az élesztő-RNS- polimeráz II írja át (24). Lehetséges, hogy az RNS-polimeráz I és III promoterei, amelyek riboszómális RNS, 5S RNS és tRNS transzkripciójára képesek (24, 25), szintén felhasználhatók az ilyen expressziós rendszerekben.

Végül számos élesztő promotor transzkripció kontrollt is tartalmaz, így ezek ki- vagy bekapcsolhatók a tenyésztés körülményeinek változtatásával. Az ilyen fajta élesztő-promoterek példáulként a következő fehérjéket kifejező gének említhetők: alkohol-dehidrogenáz II, izocitokrom-c, savas foszfatáz, nitrogén-anyagcserével asszociált lebontó enzimek gliceraldehid- 3-foszfat-dehidrogenáz, valamint a maltóz- és galaktóz- hasznosítást eszközölő enzimek (22). Az ilyen szabályozási tartomány igen hasznos lenne a fehérje-termék expressziójának szabályozására, különösen olyan esetekben, amikor ezek termelődése toxikus hatású az élesztőre. Lehetséges lehetne így egy 5'-szegélyező szekvencia szabályozási tartományának az összehozása egy nagy expressziós-fokú génből származó promotert tartalmazó 5'-szegélyező szekvenciával, – ami egy hibrid promotert eredményezne; úgy véljük, hogy ennek lehetségesnek kellene lennie, minthogy a szabályozási tartomány és a promotor egymástól fizikailag különböző DNS-szekvenciáknak látszanak.

3. Sejtkultúra-rendszerek/sejtkultúra-vektorok

A gerincesek sejtjeinek kultúrákban történő szaporítása (szövet- kultúrák tenyésztése) az utóbbi években már rutinszerűvé vált (vö.: Tissue Culture, szerk.: Kruse és Patterson, Academic Press, 1973). Ehhez a COS-7 majomvese-fibroblaszt sejtvonalat alkalmazták gazdasejtként humán immuninterferon termelésére (25a). Az itt részletezett kísérletek azonban lefolytathatók lennének bármilyen sejtvonalban amely képes egy kompatibilis vektor replikációjára és expressziójára, így például a WI38, BHK, 3T3, CHO, VERO és Hela sejtvonalak bármelyikében is. Az expressziós vektorral szemben csupán az a követelmény áll fenn, hogy legyen egy replikációs kezdőpont és egy promotor az exprimálandó gén előtti helyzetben, az adott esetben szükséges riboszómakötési helyekkel, RNS-kapcsoló helyekkel, poliadenilezési helyekkel és transzkripció terminátor- szekvenciákkal együtt. Bár az itt leírt kísérletekben az SV40 szekvencia e lényeges elemeit hasznosítottuk, meg kell jegyezni, hogy a találmány nincsen erre az előnyös kiviteli alakra, az itt szereplő szekvenciák alkalmazására korlátozva. Így például felhasználhatók lennének más virális (például Polyoma, Adeno, VSV, BPV stb.) vektorok replikációs kezdő pontjai, valamint a DNS-replikáció integrálatlan állapotban funkcióképes celluláris kezdőpontjai is.

B. Vektor-rendszerek

1. Érett immuninterferon közvetlen expressziója E. coli sejtekben

Az IFN- γ E. coli sejtekben érett interferon- polipeptidként (minusz szignál-szekvencia) történő köz-

vetlen expressziójának elérésére alkalmazott eljárás a korábban humán növekedési hormon (26) és humán leukocita-interferon (1) előállítására alkalmazott eljárásnak egy új változata volt, amennyiben szintetikus (N-terminális) és cDNS szekvenciák kombinációját alkalmaztuk.

Az alább ismertetett p69 nukleotid-szekvenciából levezethetően, valamint néhány IFN- α szignál-peptidje és az érett polipeptid közötti ismert hasítási hellyel való összehasonlítás alapján megállapítható, hogy az IFN- γ egy 20 aminosavat tartalmazó hidrofób szignálpeptidet tartalmaz, amelyet az érett IFN- γ 146 aminosav követ (5. ábra). Amint a 7. ábrából látható, egy *Bst*NI resztrikciós endonukleáz hely célszerűen az érett IFN- γ 4-helyzetű aminosavánál helyezkedik el. Két szintetikus oligodezoxinukleotidot szerkesztettünk, amelyek egy ATG transláció-iniciáló kodont, valamint az 1., 2. és 3. aminosav (cisztein-tirozin-cisztein) kodonját foglalják magukban és egy *Eco*RI tapadó (kohezív) véget alkotnak. Ezeket az oligodezoxinukleotidokat a p69-nek egy 100 bázis-párból álló *Bst*NI-*Pst*I fragmentjéhez kapcsoltuk, hogy így egy 1115 bázispárból álló szintetikus-természetes hibridgént építsünk fel, amely az IFN- γ terméket kódolja és amely az *Eco*RI és *Pst*I resztrikciós helyek által van határolva. Ezt a gént azután beillesztettük a pLeIF A trp 103 plazmidba, az *Eco*RI és *Pst*I helyek közé, és így a pIFN- γ trp 48 expresszió-plazmidot kaptuk. Ebben a plazmidban az IFN- γ gén expressziója az E. coli trp promotor irányítása alatt történik. [A pLeIF A trp 103 plazmid a pLeIF A 25 olyan származéka, amelyben az LeIF A géntől távolos *Eco*RI hely el lett távolítva. Az említett *Eco*RI helynek az eltávolítására alkalmazott eljárást az irodalomban (27) más ismertették.]

2. Expresszió élesztőben

Valamely heterológ gén, például immuninterferon cDNS élesztőben történő expressziójához egy négy komponenset tartalmazó plazmid vektort kellett meg-szerkeszteni. Az első komponens az a rész, amely lehetőséget hagy a transzformációra mind E. coli, mind élesztősejtekben és ezért tartalmaznia kell egy szelektálható gént mindegyik organizmusból. (A jelen esetben ez az ampicillin- rezisztencia génje E. coliból és a *TRP1* gén élesztőből.) Ennek a komponensnek tartalmaznia kell továbbá egy replikációs kezdőpontot (origót) mindkét organizmusból, hogy plazmidként maradjon fenn mindkét organizmusban. (A jelen esetben ez az E. coli kezdőpont a pBR322-ből és az *arsI* kezdőpont az élesztő III kromoszómájából.)

A plazmid második komponense egy nagy expressziós fokú élesztőgénből származó 5'-szegélyező szekvencia, amelynek célja, hogy elősegítse a hátrább elhelyezkedő szerkezeti gén transzkripcióját. A jelen esetben az élesztő 3-foszfoglicerát- kináz (GK) génjét alkalmazzuk e komponensként. A fragmens megszerkesztése olyan módon történt, hogy a PGK szerkezeti szekvenciából mind az ATG, mind az ATG előtti 8 bázispár eltávolításra kerüljön. Ezt a szekvenciát egy olyan szekvenciával helyettesítettük, amely mind *Xba*I, mind *Eco*RI resztrikciós helyet tartalmaz, hogy ez az 5'-szegélyező szekvencia kapcsolódhasson a szerkezeti génhez.

A rendszer harmadik komponense egy szerkezeti gén, amely oly módon van megszerkesztve, hogy

egy ATG translációs startszignál és egy translációs stoppszignál is tartalmazzon. Az ilyen gén elkülönítésének és megszerkesztésének a módját az alábbiak során ismertettük.

A negyedik komponens egy élesztő DNSszekven-
cia, amely egy oly élesztőgén 3'-szegélyező szek-
venciáját tartalmazza, amelyben megfelelő szignálok
vannak jelen a transzkripció befejezésére és a poli-
adenilezésre.

Mindezeknek a komponenseknek a jelenlétében
vált lehetségessé immuninterferon élesztőben történő
termeltetése.

3. Expresszió emlősalat-sejtkultúrában

Az immuninterferon emlősalat-sejtkultúrában tör-
ténő szintézisének stratégiája egy olyan vektor kifej-
lesztésén alapul, amely képes mind az antonóm repli-
kációra, mind pedig egy idegen génnek egy heterológ
transzkripció egység irányítása alatti expressziójára.
E vektornak a szövetszövetkultúrában történő replikációját
oly módon érték el, hogy gondoskodtunk egy SV40
vírusból szárazó DNS-replikációs kezdőpontról, emel-
lett egy segítő funkciót (T-antigén) is létrehozunk a
vektornak egy az antigént endogén módon kifejező
sejtvonalban való bevezetése útján (28, 29). Az SV40
vírus késői promotere megelőzte az interferon szer-
kezeti génjét és biztosította a gén transzkripcióját.

Az IFN- γ expressziójának lefolytatására alkalma-
zott vektor pBR322 szekvenciákból állt, amelyek egy
szelektálható jelzőt (marker) nyújtottak az *E. coli*-ban
történő szelekcióhoz (ampicillin-rezisztencia), vala-
mint egy *E. coli* kezdőpontját a DNS-replikációhoz.
Ezeket a szekvenciákat a pML-1 plazmidból (28)
nyertük; ezek átfogták az *EcoRI* és *BamHI* resztrikciós
helyeket magukban foglaló tartományt. Az SV40-kez-
dőpontot egy 342 bázis-párt tartalmazó és ezt a
tartományt átfogó PvuII-HindIII fragmensből (30, 31)
nyertük (amelynek mindkét vége *EcoRI* végződésé-
re volt átalakítva). Ezek a szekvenciák, amellyel hogy
tartalmazzák a DNS-replikáció vírus-kezdőpontját,
együtt kódolják mind a korai, mind a késői transzkri-
pciós egység promotert is. Az SV40 kezdőpont
tartományának orientációja olyan volt, hogy az in-
terferont kódoló génnel a késői transzkripciós egység
promotere volt szomszédos helyzetben.

A rajzok rövid ismertetése

Az 1. ábra az indukált periferális vér-limfocita
(PBL) poli(A)+RNS szacharóz-grádiens centrifugá-
lását szemlélteti. Az interferon-aktivitásnak két csúcs-
értéke volt megfigyelhető vonalkázott oszlopokkal
ábrázolva). 12S és 16S mérettel. A (fentiéktől füg-
getlenül centrifugált) riboszómás RNS-jelzők helyzetét
az abszorbancia-profil felett jeleztük.

A 2. ábra az indukált PBL poli(A)+RNS savas
karbamid-agarózon keresztüli elektroforézisét szem-
lélteti. Csak egy aktivitás- csúcsérték volt megfigyel-
hető, amely 18S RNS-sel migrált együtt. A szom-
szédos sávban vizsgált és etidium-bromidos festéssel
láthatóvá tett riboszómás RNS-jelzők helyzetét az
aktivitás- profil felett jeleztük.

A 3. ábra 96 kolónia indukált és indukálatlan
³²P-jelzett cDNS-próbával kapott hibridizációs képét
szemlélteti. 96 egyedi transzformánst szaporítottunk
egy mikrotiter-lemezen, a replikátumot két nitrocel-

lulóz-membránon terítettük, majd a szűrőket vagy
indukált mRNS-ből (felső kép), vagy indukálatlan
PBL-kultúrákból elkülönített mRNS-ből (alsó kép)
kapott ³²P-jelzett cDNS próbákkal hibridizáltuk. A
szűrőket azután a nemhibridizált RNS eltávolítása
céljából mostuk, majd röntgenfilmre helyeztük. Ezek
a szűrőcsoportok 8300 független kolóniát tartalmazó
86 ilyen szűrőcsoport reprezentáns képviselőjének
tekinthetők. Az „indukált” klónok egyik például szo-
lágó képviselőjét „H12”-ként jelöltük az ábrán.

A 4. ábra a 69-es klón cDNS inszertumának
resztrikciós endonukleáz „térképe”. A cDNS inszertum
PstI helyek (pontok a két végen) és oligo dC-dG
farkak (egyszerű vonalak) által van kötve. A resz-
trikciós nukleázal végzett hasítás útján kapott frag-
mentek számát és méretét 5%-os akrilamid-gélen
keresztül történő elektroforézis alapján becsültük. Az
egyes helyek helyzetét (lásd 5. ábra) nukleinsav-szek-
venálás útján azonosítottuk. A legnagyobb nyílt le-
olvasó fázis kódolási tartományát bekeretezve ábrá-
zoltuk; a vonalkázott tartomány mutatja a feltételezett
20 maradék-szignál peptid-szekvenciát, míg a pontoz-
zott szakasz az érett IIF szekvenciát (146 aminosav)
képvisele. Az mRNS 5'-vége balra, a 3'-vég pedig
jobbra van.

Az 5. ábra a p69 plazmid cDNS inszertumának
nukleotid- szekvenciáját szemlélteti, az IFN- γ
leggyakoribb allél-alakját mutatva. Látható a leghosz-
szabb nyílt leolvasófázis levezetett aminosavszekven-
ciája is. A feltételezett szignál-szekvenciát az „S1”
és „S20” jelek közötti maradékok képviselik.

A 6. ábra az IFN- γ mRNS szerkezetének a leukocita
(IFN- α) és fibroblaszt (IFN- β) interferon szekezetével
való összehasonlítását mutatja. Az „Immun” jelzésű
69-es klón mRNS-e szignifikánsan nagyobb meny-
nyiségben tartalmaz „lefördítatlan” szekvenciákat.

A 7. ábra az IFN- γ expressziós plazmidjának a
pIFN- γ trp48 felépítésének vázlatos diagrammja. Ki-
indulási anyag a p69 plazmidból származó 1250
bázispárt tartalmazó PstI cDNA.

A 8. ábra az IFN- γ majom-sejtekben történő exp-
ressziójára alkalmazott plazmid diagrammja.

A 9. ábra nyolc különböző, *EcoRI* enzimmel kezelt
humán genom DNS-nek a p69 plazmid tyha cDNS
inszertumából származó, ³²P-jelzett, 600 bázispárt
tartalmazó *DdeI* fragmensével történő Southern-féle
hibridizációját szemlélteti. Két *EcoRI* fragmens tisztán
hibridizál a próbával mindegyik DNS-mintában.

A 10. ábra nyolc különböző resztrikciós endonuk-
leázal kezelt humán genomikus DNS-ének a p69
plazmidból származó ³²P-jelzett szondával történő
Southern-féle hibridizációját mutatja.

A 11. ábra a pB1 vektor 3.1 kbp *HindIII* inszertum
(amelyből a PGK promotor elkülönítése történt) resz-
trikciós térképét mutatja. Látható egy *EcoRI* helynek
és egy *XbaI* helynek a PGK gén 5'-szegélyező
DNS-ébe való beiktatása.

A 12. ábra az 5'-szegélyező szekvenciát és a PGK
gén kezdeti kódoló szekvenciáját mutatja az *XbaI* és
EcoRI helyek beiktatása előtt.

A 13. ábra egy *XbaI* helynek a PGK promotor
8-helyzetébe történő beiktatására, valamint az említett
XbaI-véget és egy *Sau3A* véget tartalmazó PGK-5'-
szegélyező szekvencia 39bp fragmentjének elkülöní-
tésére alkalmazott eljárást szemlélteti vázlatosan.

A 14. ábra vázlatosan mutatja egy a fenti 39bp fragmenst, továbbá a *PvuI*-től *Sau3A*-ig terjedő 265bp PGK-5'-szegélyező szekvenciát (lásd 11. ábra és egy az *XbaI*-hellyel szomszédos *EcoRI* helyet tartalmazó 300bp fragment felépítési módját.

A 15. ábra az 1500bp PGK promoter-fragment (*HindIII/EcoRI*) felépítési módját szemlélteti vázlatosan; ez a fragment a 14. ábrán vázolt módon felépített fragment mellett egy *HindIII*-től *PvuI*-ig terjedő 1300bp fragment is tartalmaz a PGK-5'-szegélyező szekvenciából (lásd 11. ábra).

A 16. ábra egy humán immuninterferon élesztőben történő expressziójára alkalmas expressziós vektor összetételét szemlélteti; ez a vektor a módosított PGK-promotort, az IFN- γ cDNS-t és az élesztő-PGK-gén terminátor- tartományát tartalmazza, amint ezt az alábbiakban részletesebben ismertetjük.

Az eljárás részletes leírása

A. Az IFN- γ mRNS eredete

Periferális vér-limfocitákat (PBL) emberi donorktól szereztünk leukoforézis útján. A PBLs-t Ficoll-hypaque gradiens- centrifugálással tisztítottuk tovább, majd 5×10^6 sejt/ml koncentrációig tenyésztettük egy 1% L-glutamint, 25 mM HEPES-t és 1% penicillin-sztreptomycin-oldatot (Gibco, Grand Island, N. Y.) tartalmazó RPMI 1640 táptalajon. Ezeket a sejteket azután nitrogén staphylococcus-enterotoxin B (1 μ g/ml) segítségével indukáltuk IFN- γ termelésére 24–48 óra hosszat tenyésztettük őket 37 °C hőmérsékleten, 5% CO₂ jelenlétében. A PBL-tenyészethez 0,1 μ g/ml dezacetiltimozin- α -1-et adtunk az IFN- γ aktivitás viszonylagos hozamának növelése céljából.

B. A messenger-RNS elkülönítése

Az összRNS-nek a PBL kultúrákból való extrakcióját lényegileg az S. L. Berger és munkatársai (33) által leírt módszerrel végeztük. A sejteket centrifugálással tömörítettük, majd 10 mmól/l nátrium-kloridot, 10 mmól/l trisz-hidrokloridot (pH=7,5) 1,5 mmól/l magnézium-kloridot és 10 mmól/l ribonukleozid-vanadil-komplexet tartalmazó oldatban újra szuszpendáltuk őket. NP-40 (1%-os végkoncentrációban) való hozzáadásával lizáltuk a sejteket és a sejtmagokat centrifugálással tömörítettük. Az összRNS-t a szupernatáns folyadék tartalmazta, ezt fenollal és kloroformmal való többszöri extrakcióval tisztítottuk tovább. A vizes fázishoz nátrium-kloridot adtunk 0,2 mól/l koncentrációig, majd kétszeres térfogatú etanol hozzáadása útján az összRNS-t leválasztottuk. Az indukátlan (nem-stimulált) kultúrákból ugyanezzel a módszerrel választottuk le az RNS-t. Oligo-dT cellulóz-kromatográfiát alkalmaztunk az mRNS-nek a teljes RNS-készítményekből történő tisztítására (34). 1–2 liter PBL kultúrából 5–10 mg összes RNS és 50–200 μ g Poly(A)+RNS volt általában kinyerhető.

C. Az mRNS méret szerinti frakcionálása

Kétféle módszert alkalmaztunk az mRNS-készítmények frakcionálására. Ezeket a módszereket egymástól függetlenül (tehát nem együttesen) alkalmaztuk; mindkettővel az IFN-mRNS szignifikáns mértékű dúsítását értük el.

Az mRNS frakcionálására elsősorban formamid denaturálószer jelenlétében történő szacharóz-grádiens

centrifugálást alkalmaztunk. 70%-os formamidban 5%-tól 25%-ig menő szacharóz- gradienssel (32) centrifugáltunk 154 000 g-vel, 20 °C hőmérsékleten, 19 óra hosszat. 0,5 ml-es egymásutáni frakciókat vettünk el a gradiens tetejéről, ezeket etanollal lecsaptuk és egy-egy hányadrészt *Xenopus laevis* oocitákba injektáltunk az mRNS transzlációja céljából (35). 24 óra hosszat inkubáltunk szobahőmérsékleten, majd az inkubációs közeget vírusellenes aktivitásra vizsgáltuk a standard citopátiás hatás-gátlási módszerrel, vezikuláris sztomatitisz-vírus (Indiana-törzs), vagy encefalomiokarditisz-vírus WISH (humán amnion) sejteken, a Stewart (36) által leírt módon, azzal az eltéréssel, hogy a mintákat 4 óra helyett 24 óra hosszat inkubáltuk a sejtekkel a vírussal történő fertőzés előtt. Minden esetben két aktivitásértéket figyeltünk meg a szacharóz-grádienssel frakcionált RNS-sel (1. ábra). Az egyik csúcs 12S számított méretnek megfelelően ülepedett és 1 mikrogramm injektált RNS-re számítva 100–400 egység/ml vírusellenes aktivitást tartalmazott (egy IFN- α standardhoz viszonyítva). A másik csúcs 16S méretnek megfelelően ülepedett és körülbelül fele akkora aktivitást mutatott, mint az előbbi, lassabban ülepedő csúcs. Úgy látszik, hogy mindkét aktivitási csúcs IFN- γ -tól származik, mert ha ugyanezeket a frakciókat MDBK marha-sejtvonalon vizsgáltuk (amelyet a humán IFN- γ tudvalevőleg nem véd), akkor nem tapasztaltunk semmi aktivitást. Ha viszont IFN- α aktivitás illetőleg IFN- β aktivitás lett volna jelen, ez az MDBK próbával (5) könnyen kimutatható lett volna.

200 μ g mRNS-t elektroforézissel is frakcionáltunk, savas karbamid-agaróz gélen keresztül. Az agaróz gél-lemez (37, 38) 1,75% agarózt, 0,025 mól/l nátrium-citrátot (pH=3,8) és 6 mól/l karbamidot tartalmazott. Az elektroforézist 25 milliamper árammal, 4 °C hőmérsékleten, 7 óra hosszat végeztük. A gél ezután borotvapengével szeleteltük frakciókra. Az egyes szeleteket 70 °C hőmérsékleten megolvastottuk, majd fenollal kétszer, kloroformmal pedig egyszer extraháltuk. A frakciót ezután etanollal lecsaptuk, majd *Xenopus laevis* oocitákba történő injekció és vírusellenes próba útján vizsgáltuk IFN- γ mRNS tartalomra. A gél-frakció mintákban csupán egyetlen aktivitásértéket találtunk (2. ábra). Ez a csúcs a 18S RNS-sel együtt migrált és az injektált RNS 1 mikrogrammjára számítva 600 egység/ml aktivitást mutatott. Ez az aktivitás is specifikusan IFN- γ aktivitásnak mutatkozott, mintogy az MDBK sejteknek nem nyújtott védelmet.

A szacharóz-grádienssel történő frakcionálás aktivitás- csúcsértékei (12S és 16S) és a savas karbamid-gélen történő frakcionálás aktivitásértéke (18S) közötti eltérés azzal a megfigyeléssel magyarázható, hogy ezeket az egymástól független frakcionálási módszereket nem végeztük teljesen denaturáló körülmények között.

D. IFN- γ szekvenciákat tartalmazó kolónia-„könyvtár” előállítás

3 μ g gélen frakcionált mRNS-t alkalmaztunk ket-tösszálú cDNS standard eljárásokkal (26, 39) történő előállítására. A cDNS-t méret szerint frakcionáltuk 6%-os poliakrilamid gélen. Elektroelúció útján két méret szerinti frakciót kaptunk, 800–1500 bázis-párral

(138 ng) illetőleg 1500 feletti bázis-párral (204 ng). Mindkét méretű cDNS frakcióból egy-egy 35 ng-nyi részt dezoxiC maradékkal hosszabbítottunk meg terminális dezoxinukleotidil-transzferáz (40) alkalmazásával és a PstI helyen hasonló módon dezoxiG maradékkal meghosszabbított pBR322 plazmiddal (300 ng) kezeltük őket (41). Mindkét ily módon kezelt elegyet azután *E. coli* K12 294-törzsbe transzformáltuk. Megközelítőleg 8000 transzformánst kaptunk a 800–1500 bp cDNS frakcióval és 400 transzformánst az 1500 feletti bp cDNS frakcióval.

E. A kolónia-könyvtárak szűrővizsgálata indukált cDNS-re

Az egyes kolóniákat külön-külön beoltottuk mikrotiter-lemezek LB (58) mellett 5 µg/ml tetraciklint tartalmazó mélyedéseibe és dimetil-szulfoxid 7% koncentrációig történő hozzáadása után -20 °C hőmérsékleten tároltuk a lemezeket. A kolónia-könyvtár két kópiáját hagytuk kifejlődni nitrocellulóz szűrőkön, majd mindegyik kolóniából a DNS-t Grunstein-Hogness (42) módszere szerint rögzítetük a szűrőhöz.

Indukált és indukálatlan PBL tenyészetekből ³²P-vel jelzett cDNS próbákat készítettünk ezután, gélen frakcionált 18S mRNS felhasználásával. Oligo dT₁₂₋₁₈ primert alkalmaztunk és a reakciót a már leírt (1) körülmények között folytattuk le. A cDNS 600–1500 bp méretű frakcióiból kapott 8000 transzformánst, valamint cDNS 1500 bp méretű frakcióiból kapott 400 transzformánst tartalmazó szűrőket 20x10⁶ cpm indukált ³²P-cDNS-sel hibridizáltuk. Egy hasonló módon elkészített párhuzamos szűrő-sorozatot 20x10⁶ cpm indukálatlan ³²P-cDNS-sel hibridizáltunk. A hibridizálást 16 óra hosszat folytattuk a Fritsch és munkatársai (43) által leírt körülmények között. A szűrőket ezután alaposan mostuk (43) majd 16–48 órai időtartamra Kodak XR-5 röntgen-filmre helyeztük őket Dupont „Lightning-plus” erősítő szűrő alkalmazásával. Mindegyik kolónia esetében összehasonlítottuk egymással a két próbával kapott hibridizáció-képet. A kolóniák körülbelül 40%-a tisztán megállapíthatóan hibridizált mindkét próbával, míg a kolóniák körülbelül 50%-a a szondák egyikével nem mutatott hibridizációt (lásd 3. ábra). 124 kolónia szignifikáns módon hibridizált az indukált próbával, de nem volt kimutatható (vagy igen gyenge volt) hibridizációjuk az indukálatlan próbával. Ezeket a kolóniákat azután külön-külön inokuláltuk mikrotiter-lemezek mélyedéseibe, hagytuk kifejlődni őket, majd nitrocellulóz-szűrőkre vittük át és ugyanazzal a két próbával hibridizáltuk őket a fent leírt módon. Valamennyi ilyen kolóniából elkülönítettük a plazmid DNS-t egy ismert gyors módszer (44) alkalmazásával, ezt szintén nitrocellulóz-szűrőkhöz kötöttük és hibridizáltuk (45) az indukált illetőleg indukálatlan próbákkal. 22 kolóniából kapott DNS csupán az indukált próbával hibridizált; ezeket „indukált” kolóniákként jelöltük meg.

F. Az indukált kolóniák jellemzése.

Öt indukált kolóniából plazmid-DNS-t készítettünk (46) és ezt a cDNS betétek jellemzésére használtuk fel. Az 5 indukált plazmid (p67, p68, p69, p71 és p72) restriktions endonukleáz-térképe azt mutatta, hogy ezek közül négy plazmidnak hasonló restriktions nuk-

leáz térképe volt. E négy plazmid (p67, p69, p71 és p72) egyaránt 4 *DdeI* helyet, 2 *HinfI* helyet és egyetlen *RsaI* helyet tartalmazott a cDNS inszertumban. Az 5. plazmid (p68) egy közös *DdeI* fragmenst tartalmazott és a másik négyhez viszonyítva rövid cDNS klónnak látszott. A restriktions nukleáz-térképek által mutatott homológiát a hibridizáció eredménye is megerősítette. A p67 plazmid egy 600 bp *DdeI* fragmenséből egy ³²P-vel jelzett DNS próbát készítettünk (47) és ezt a többi indukált kolónia hibridizálására (42) alkalmaztuk. Mind az öt restriktions nukleázal térképezett kolónia kereszthibridizációt mutatott ezzel a próbával, ugyanúgy mint az indukált/indukálatlan szűrővizsgálattal kapott 124 kolóniából kiválasztott 17 további kolónia mindegyike is. Az ezekben a kereszthibridizáló plazmidok mindegyikében lévő cDNS inszertum hosszúságát *PstI* enzimesszel és gél-elektroforézissel határoztuk meg. Úgy találtuk, hogy a 69-es klón tartalmazza a leghosszabb cDNS inszertumot, ennek hossza 1200–1400 bázis-pár volt. Az összes további kísérlethez ezt a DNS-t alkalmaztuk; restriktions endonukleáz-térképét a 4. ábra mutatja.

A p69 cDNS-inszertuma nem más, mint az IFN-γ cDNS, amely három egymástól független expressziós rendszerben termelődött és vírusellenes aktivitást mutat, amint ezt az alábbiakban részletesebben ismertetjük.

G. A p69 cDNS-inszertumának szekvencia-analízise

A p69 plazmid cDNS-inszertumának teljes nukleotid-szekvenciáját a didezoxinukleotid lánc-terminációs módszerrel (48) határoztuk meg fragmenseknek az M13 mp7-vektorba történő szubklonozása (49) után; meghatároztuk továbbá ezt a szekvenciát a Maxam-Gilbert-féle kémiai eljárással (52) is. A leghosszabb nyílt leolvasó-fázis egy 166 aminosavból álló fehérjét kódol; ezt az 5. ábra szemlélteti. Az első kódolt maradék a cDNS 5'-végén elsőnek talált metkodon. Az amino-végén álló első 20 maradék valószínűleg szignál-szekvenciául szolgál a fennmaradó 146 aminosav szekréciójához. Ez a feltételezett szignál-szekvencia olyan vonásokat mutat – mint a méret és a hidrofobitás – amelyek közesek más már jellemzett szignál-szekvenciák megfelelő vonásaival. Emellett a feltételezett hasítási szekvenciánál talált négy aminosav (ser-leu-gly-cys) azonos több leukocita-interferon, mint a LeIF B, C, D, F és H (2) hasítási pontjánál levő négy maradékkal. A kódolt érett, 146 aminosav tartalmazó szekvencia (a továbbiakban „rekombináns humán immuninterferon”) molekulatömege 17140.

A kódolt fehérje-szekvenciában két lehetséges glikozilezési hely (50) van, a 28–30 aminosavaknál (asn-gly-thr) és a 100–102 aminosavaknál (asn-tyr-ser). E helyek létezése összhangban áll a humán-γ megfigyelt glikozileződésével (6, 51). Emellett a jelenlevő összesen két cisztein-maradék (az 1- és 3-helyzetben) szterikusán túlságosan közel van egymáshoz, hogy diszulfid-hidat képezhessen, ami szintén összhangban áll az IFN-γ redukálószerrel, mint β-merkaptó-etanol jelenlétében megfigyelt stabilitásával (51). A levezetett érett aminosav-szekvencia általában eléggé bázikus, 30 összes lizin-, arginin- és hiszti-

din-maradékkal és csupán 19 összes aszparaginsav- és glutaminsav-maradékkal.

A p69 plazmid DNS-szekvenciájából levezethetően az IFN- γ mRNS-jének szerkezete határozottan eltér az IFN- α (1, 2) illetve IFN- β (5) mRNS-jének szerkezetétől. Amint ezt a 6. ábra szemlélteti, az IFN- γ kódolási tartománya rövidebb, míg az 5'-lefordítatlan és 3'-lefordítatlan tartományok jóval hosszabbak, mint akár az IFN- α , akár az IFN- β megfelelő tartományai.

H. Rekombináns humán immuninterferon kifejeződése *E. coli*-ban

Amint a 7. ábra szemlélteti, 50 μ g p69 plazmidot PstI enzimmel kezeltünk, majd az 1250 bázispárt tartalmazó inszertumot 6%-os poliakrilamid-gélen lefolytatott gélelektroforézissel különítettük el. Körülbelül 10 μ g ilyen inszertumot elektroelúció útján nyertünk ki a gélből. 5 μ g ilyen PstI fragmenst 3 egység BstNI enzimmel (Bethesda Research Labs) 15 percig kezeltünk 37 °C hőmérsékleten részlegesen lebontás céljából, majd a reakcióelegyet 6%-os poliakrilamid-gélen tisztítottuk. Körülbelül 0,5 μ g mennyiségben nyertük ki a kívánt, 1100 bázispárt tartalmazó BstNI-PstI fragmenst. A két említett dezoxioligonukleotidet 5'-dAATTCATGTGTTATTGTC és 5'-dTGACAATAACACATG (7. ábra) – a foszforizációs módszerrel (53) szintetizáltuk, majd az alábbi módon foszforileztük őket: mindkét dezoxioligonukleotidból 100 pmól mennyiséget egyesítettünk egymással 30 μ l 60 mmól/l trisz-HCl (pH=8), 10 mmól/l magnézium-klorid, 15 mmól/l β -merkaptoetanol és 240 μ Ci (γ -³²P)ATP (Amersham, 5000 Ci/mmól) tartalmú elegyben. Ehhez az elegyhez azután 12 egység T4 polinukleotid-kinázt adtunk és az elegyet 30 percig hagytuk reagálni 37 °C hőmérsékleten. Ezt követően 1 μ l 10 mmól/l ATP-oldatot adtunk hozzá és az elegyet további 20 percig hagytuk reagálni. Fenollal és kloroformmal történő extrakció után a kapott oligomereket a BstNI-PstI 1100 bázispárt tartalmazó fragmens 0,25 μ g-jával elegyítettük és etanolal lecsaptuk. Az így kapott fragmenseket 20 mmól/l trisz-HCl (pH=7,5), 10 mmól/l magnézium-klorid, 10 mmól/l ditio-treitol, 0,5 mmól/l ATP és 10 egység T4 DNS-ligáz tartalmú oldat 30 μ l-jével 2 óra hosszat kezeltük 20 °C hőmérsékleten. Az elegyet azután a kohezív végek kapcsolódása révén fellépő polimerizáció kiküszöbölése céljából 1 óra hosszat kezeltük 31 egység PstI és 31 egység EcoRI enzimmel, majd 6%-os poliakrilamid-gélen történő elektroforézissel vetettük alá. Az 1115 bázispárt tartalmazó terméket (110 000 cpm) elektroelúció útján nyertük ki.

A pLeIF A trp 103 plazmid (7. ábra) a pLeIF A 25 plazmid (1) olyan származéka, amelyből a LeIF A génhez távolos EcoRI-helyet eltávolítottunk (27). 3 μ g pLeIF A trp 103 plazmidot 20 egység EcoRI és 20 egység PstI enzimmel kezeltünk 90 percig 37 °C hőmérsékleten, majd 6%-os poliakrilamid-gélen elektroforizáltuk. A nagy (körülbelül 3900 bázispárt tartalmazó) vektor-fragmenst elektroelúció útján nyertük ki. Az 1115 bázispárt tartalmazó EcoRI-PstI IFN- γ DNS-fragmentet 0,15 μ g fenti módon előállított vektorba kapcsoltuk. Az *E. coli* K-12 294 törzs (ATCC 31 446 sz.) transzformációja 120 tetraciklin-rezisztens kolóniát eredményezett.

Plazmid DNS-t állítottunk elő 60 fenti módon kapott transzformánsból, majd ezeket EcoRI és PstI enzimmel kezeltük. Az így kapott plazmidokból három tartalmazta a kívánt 1115 bázispárból álló EcoRI-PstI fragmenst. A DNS szekvencia-analízise igazolta, hogy ezeknek a plazmidoknak a kívánt nukleotid-szekvenciájuk van a trp promotor, szintetikus DNS és cDNS közötti kapcsolódási helyeknél. A további vizsgálatokhoz e plazmidok egyikét, a pIFN- γ trp 48 plazmidot választottuk. Ezt a plazmidot használtuk föl az *E. coli* K-12 W3110 törzs (ATCC 27 325 sz.) transzformálására.

I. Az IFN- γ -kódoló szekvencia génszerkezete

Az IFN- γ -t kódoló gén szerkezetét a Southern-féle hibridizációs módszerrel vizsgáltuk. E módszer (54) szerint 5 μ g nagy molekulatömegű humán limfocita DNS-t [amelyet az irodalomban (55) leírt módon állítottunk elő] különböző restrikciós endonukleázokkal kezeltünk az emésztés befejezéséig, majd 1,0%-os agaróz-gélen (56) elektroforézissel vetettük alá és nitrocellulóz-szűrőre (54) itattuk fel a terméket. A p69 cDNS-inszertumának 600 bázispárt tartalmazó DdeI fragmentjéből egy ³²P-jelzett DNS-próbát állítottunk elő (47) és ezt a fenti nitrocellulóz-DNS készítménnyel hibridizáltuk (43). A próba 10⁷ cpm/percet számláló mintáját 16 óra hosszat hibridizáltuk, majd az irodalomban (43) leírt módon mostuk. Különböző humán donorokból származó 8 genomos DNS-mintát az EcoRI restrikciós endonukleázzal kezeltünk, majd ezeket is hibridizáltuk a p69 ³²P-jelzett szondával. Amint ezt a 9. ábrán szemléltetjük, két tiszta hibridizációs szignál volt megfigyelhető, amelyek mérete 8,8 kilo-bázispár (kbp) illetve 2,0 kbp volt (a HindIII enzimmel kezelt λ DNS mobilitásával való összehasonlítás alapján becslésérték). Ez az eredmény vagy két IFN- γ géntől, vagy pedig egyetlen, egy EcoRI hely által hasított géntől származhat. Minthogy a p69 cDNS nem tartalmaz EcoRI helyet, egy belső EcoRI helyet tartalmazó közbelépő (intron) szekvenciára volna szükség ahhoz, hogy egyetlen gén feltételezésével magyarázzuk meg a fenti eredményt. Abból a célból, hogy a fenti két lehetőség között különbséget tehesünk, egy további Southern-féle hibridizációt végeztünk ugyanazzal a szondával, egyetlen humán DNS 5 további endonukleázos emésztési termékével (10. ábra). Két hibridizáló DNS-fragmentet kaptunk két további endonukleázos emésztési termékéből: PvuII (6,7 kbp és 4,0 kbp) és HincII (2,5 kbp és 2,2 kbp). Három endonukleázos emésztés adott csupán egyetlen hibridizáló DNS-fragmentet, HindIII (9,0 kbp), BglII (11,5 kbp) és BamHI (9,5 kbp). Két IFN- γ gént kellett volna kapcsolni szokatlanul kis távolságra egymástól (kevesebb, mint 9,0 kbp) ahhoz, hogy ezek ugyanabban a HindIII hibridizáló fragmentben foglaljanak helyet. Ez az eredmény arra mutat, hogy csupán egyetlen homológ IFN- γ gén (számos rokon IFN- α géntől eltérően) van jelen a humán genomális DNS-ben és hogy ezt a gént egy vagy több, EcoRI, PvuII és HincII helyeket tartalmazó intron hasítja. Ezt a feltevést támogatja az a hibridizációs kísérlet is, amelyet éppen a p69 cDNS 3'-lefordítatlan tartományából készített ³²P-jelzett (47) fragmenssel (103 bp DdeI fragment 860 bp-tól 990 bp-ig az 5. ábrán) végeztünk egy humán

genomiális DNS *EcoRI* emésztési termékkel szemben. Ehhez a próbához csak a 2,0 kbp *EcoRI* fragmens hibridizált, ami arra mutat, hogy ez a fragment a 3'-lefordítatlan szekvenciát tartalmazza, míg a 8,8 kbp *EcoRI* fragmens tartalmazza az 5'-lefordítatlan szekvenciát. Az IFN- γ gén szerkezete (egy gén, legalább egy intronnal) határozottan eltér az IFN- α [több gén (2) intronok nélkül (56)] és az IFN- β -tól [egy gén intronok nélkül (57)].

J. Baktérium-kivonatok készítése

Az *E. coli* W3110 pIFN- γ trp 48 törzs éjjelen át inkubált kultúráját pIFN- γ trp 48 hozzáadásával (Luria hús-főzet+5 μ g/ml tetraciklint tápközegben) alkalmaztuk egy 0,2% glükózt, 0,5% kazamínosavat és 5 μ g/ml tetraciklint 1:100 hígításban tartalmazó M9 tápközeg (58) beoltására. Ehhez azután indol- akril-savat adtunk 20 μ g/ml végkoncentrációig, amikor az A₅₅₀ érték 0,1 és 0,2 között volt. A₅₅₀-1,0-nál centrifugálás útján 10 ml-es mintákat dolgoztunk fel és a kinyert terméket azonnal újra szuszpendáltuk 1 ml foszfát puffer sóoldatban, amely 1 mg/ml marha szérum-albumint tartalmazott (PBS-BSA). A sejteket szonikálás útján feltártuk és a sejt-törmelékeket centrifugálással eltávolítottuk. Az elkülönített szupernatáns oldatot a további feldolgozásig 4 °C hőmérsékleten tároltuk. A szupernatáns oldatok interferon-aktivitását IFN- α standardokkal való összehasonlítás útján a citopátiás hatást (CPE) gátlási próbával határoztuk meg és 250 egység/ml-nek találtuk.

K. Élesztő-törzsek transzformációja és közegek

Az élesztő-törzsek transzformációja az irodalomban (59) leírt módszerekkel történt. Az *E. coli* JA300 (*thr* *LeuB6* *thyA* *trp* (1117) *hsdM* *hsdR* *str*^R) törzsek (20) alkalmaztuk funkcionális TRPI gént tartalmazó plazmidok szelektálására. Az (a *trp1* *gal2* *SUC2* mal CUP I) genotípusú RH21 8 élesztő-törzset alkalmaztuk élesztőtranszformálására gazdaszervezetként. Az RH218 törzset az American Type Culture Collection gyűjteményében ATCC 44076 sz. alatt helyeztük letétbe korlátozás nélkül. A Miller (58) által leírt M9 minimális tápközeget 0,25% kazamínosav (CAA), LB dus tápközeggel és 20 μ g/ml, ampicillin hozzáadásával autoklavban sterilizáltuk és lehűtöttük. Az élesztő szaporítására 1% élesztőkivonatot, 2% peptont és 2% glükózt $\pm$ 3% Difco agart tartalmazó YEPD tápközeget és 6,7 g/l aminosavak nélküli élesztő- nitrogénbázist (YNB, Difco), 10 mg/l adenint, 10 mg/l uracilt, 5 g/l kazamínosavat (CAA), 20 g/l glükózt és $\pm$ 30 g/l agart tartalmazó YNB+CAA tápközeget alkalmaztunk.

L. Élesztő expressziós vektorfelépítése

1. 10 μ g Yrp7-et (14, 15, 16) *EcoRI* enzimmel kezeltük. A kapott tapadó DNS-végeket DNS-polimeráz I (Klenow-fragmen) alkalmazásával tettük tompákká. A vektort és az inszertumot 1%-os agaróz-gélen (SeaKem) futtatuk, kivágtuk a gélről, elektroeluáltuk, egyenlő térfogatú kloroform és fenol elegyével kétszer extraháltuk, majd etanollal kicsaptuk. A kapott tompavégű DNS-molekulákat 50 ml végtérfogatban 12 óra hosszat ligáltuk 12 °C hőmérsékleten. Ezt a ligációs elegyet használtuk fel azután az *E. coli* JA300 törzs transzformálására ampicillin-rezisztenci-

ára és triptofán-prototró. A *TRPI* gént mindkét orientációban tartalmazó plazmidokat különítettünk el. A pFRW1 plazmid a *TRPI* gént ugyanolyan orientációban tartalmazta, mint az Yrp7, míg a pFRW2 plazmid a *TRPI* gént az ellenkező orientációban tartalmazta.

20 μ g pFRW2 plazmidot *HindIII*-mal linearizáltunk és 1%-os agarózgélen elektroforizáltuk. A lineáris molekulákat eluáltuk a gélről és 200 ng-ot a pB1 plazmid (13) 3.1 kb *HindIII* inszertumának 500 ng-jával kapcsoltunk (ez utóbbi egy restrikciós fragmens, amely az élesztő 3-foszfogllicerát-kináz génjét tartalmazza). A ligációs elegyet használtuk fel azután az *E. coli* 294 törzs ampicillin-rezisztenciára és tetraciklin-szenzitivitásra való transzformálására. Az egy ilyen rekombinánsból előállított plazmid egy intakt *TRPI* gént tartalmazott, a pB1 betét-DNS 3.1 kbp *HindIII* fragmentjével a tetraciklin-rezisztencia gén *HindIII* helyén. Az így kapott termék a pFRM31 plazmid. 5 μ g pFRM31 plazmidot teljesen lebontottuk *EcoRI* enzimmel; a terméket fenollal és kloroformmal kétszer extraháltuk, majd etanollal kicsaptuk. A kapott molekula kohezív végeit DNS-polimeráz I (Klenow fragmens) alkalmazásával betöltöttük, oly reakcióelegyben, amelyben mindegyik dezoxinukleozid-trifoszfátot 250 μ M koncentrációra állítottuk be. A reakciót 20 percig folytattuk 14 °C hőmérsékleten, ekkor a DNS-t fenol és kloroform elegyével kétszer extraháltuk és etanollal kicsaptuk a terméket. Az újból szuszpendált DNS-t azután *ClaI* enzimmel teljesen lebontottuk, majd 6%-os akrilamidgelen elektroforizáltuk. A vektor-fragmenst eluáltuk a gélről, fenol és kloroform elegyével extraháltuk és etanollal kicsaptuk.

A humán eredetű tisztított 3-foszfogllicerát enzim hat N-terminális aminosava a következő volt:

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6
SER - LEU - SER - HSM - LYS - LEU -

A belső *HincII* helyet tartalmazó 141 bp *Sau* 3A-*Sau* 3A restrikciós fragmens (lásd a PGK restrikciós térképet a 11. ábrán) DNS-szekvenciájából kapott transzlációs leolvasófázisok egyike az alábbi aminosav-szekvenciát képezi:

1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6
Met - SER - LEU - SER - SER - LYS - LEU -

A kezdeti metoinin eltávolítása után látható, hogy a PGK N-terminális aminosav-szekvenciájának 6 aminosava közül 5 homológ a humán PGK N-terminális aminosav-szekvenciájával.

Ez a szekvencia-meghatározási eredmény arra mutat, hogy a pB1 plazmid 141 bp *Sau*3A restrikciós fragmensében a DNS az élesztő-PGK szerkezeti gén kezdeti szakaszát kódolja. Korábbi kutatások (20) azt mutatták, hogy a PGK mRNS-t képező DNS-szekvenciák a *HindIII* fragmens tartományában foglalhatnak helyet. A 141 bp *Sau*3A fragmens további szekvencia-képzése a PGK promoter több DNS-szekvenciáját eredményezte (12. ábra).

Egy 5' ATTTGTTGTAAA3' szekvenciájú szintetikus oligonukleotidot szintetizáltunk a szokásos módszerekkel [vö.: Crea és munkatársai: *Nucleic Acids Res.* 8, 2331 (1980)]. E primer 100 ng-ját az 5'-végnél ³²P-vel jeleztük 10 egység T4 plinukleotid-kináz alkalmazásával egy 200 μ Ci [γ -³²P] ATP-t tartalmazó 20 μ l reakcióelegyben. Ezt a jelölt primer-oldatot

használtuk fel azután egy primer-javítási reakcióban, amely úgy volt megtervezve, hogy első lépés legyen egy többlépéses eljárásban egy *EcoRI* restriktációs helynek a PGK szerkezeti gén szekvenciáját éppen megelőző PGK-5'-szegélyező DNS-be való bevitelére.

100 µg pB1 plazmidot (20) teljesen lebontottunk *HaeIII* enzimmel, majd 6%-os poliakrilamid-gélen futattuk. Az etidummal megfestett gél legfelső sávját (amely a PGK promoter- tartományt tartalmazza) a fentebb ismertetett módon, elektroelúció útján elkülönítettük. Az így kapott terméket, amely a DNS 1200 bp *HaeIII* darabja, *HincII*-vel emésztettük, majd 6%-os akrilamid-gélen futattuk. A 650 bp sávot elektroelúció útján elkülönítettük. 5 µg DNS-t kaptunk. A DNS mellett a 650 bp-os *HaeIII*-*HincII* darabját 20 µl vízben újból szuszpendáltuk, majd a fent leírt foszforilezett primer-oldat 20 µl-jével elegyítettük. Ezt az elegyet fenol és kloroform elegyével egyszer extraháltuk, majd etanollal lecsaptuk a terméket. A szárított DNS-t 50 µl vízben újból szuszpendáltuk, majd egy forrásban levő vízfürdőben 7 percig melegítettük. Az oldatot azután szárazjég-etanol fürdőben hirtelen (10–20 másodperc alatt) lehűtöttük, majd jeges vízfürdőbe vittük át. Ehhez az oldathoz 50 µl olyan oldatot adtunk, amely 10 µl 10X DNS-polimeráz I puffert (Boehringer Mannheim), mindegyik dezoxinukleozid- trifoszfát 10 ml-jét (dATP, dTTP, dGTP és dCTP) 2,5 mmól/l koncentrációban tartalmazó oldatot, 25 µl vizet és 5 egység DNS-polimeráz I Klenow-fragmenst tartalmazott. Ezt a 100 µl reakcióelegyet 4 óra hosszat inkubáltuk 37 °C hőmérsékleten. Ezután fenol-kloroform elegyével egyszer extraháltuk, a terméket etanollal kicsaptuk, liofileztük és 10 egység *Sau3A*-val teljesen emésztettük. A kapott oldatot 6%-os poliakrilamid-gélen futattuk. A 39 bázispár méretnek megfelelő sávot levágtuk a gélről, majd elektroelúció útján a fent leírt módon elkülönítettük a terméket. Ennek a 39 bp terméknek egy tompa vége és egy *Sau3A* tapadó vége van. Ezt a fragmenst egy módosított pFIF trp 69 vektorba (5) klónoztuk. 10 µg pFIF trp 69-et *XbaI*-gyel lineárizáltunk és fenol-kloroform elegyével egyszer extraháltuk, majd etanollal lecsaptuk. Az *XbaI* tapadóvég betöltésére DNS-polimeráz I Klenow-fragmenst alkalmaztunk egy 50 µl térfogatú, mindegyik nukleozid-trifoszfátot 250 µmól koncentrációban tartalmazó reakcióelegyben. Ezt a DNS-t *BamHI* alkalmazásával levágtuk, majd 6%-os poliakrilamid gélen futattuk. A vektor- fragmenst elektroelúció útján elválasztottuk a gélből, majd 20 µl vízben újra szuszpendáltuk. E vektor 20 ng-ját 20 ng fenti módon előállított 39 bp fragmenssel ligáltuk szobahőmérsékleten 4 óra hossz-
 125 szat. A ligációs reakcióelegy 1/5 részét használtuk fel az *E. coli* 294 törzs ampicillin- rezisztenciára való transzfomálására (LB+20 µg/ml amp lemezen). A transzfománsokból kapott plazmidokat egy gyors szkrin-módszerrel (44) vizsgáltuk. Egy plazmidot a pPGK-39-t választottuk ki szekvencia-analízis céljára. E plazmid 20 µg-ját *XbaI* enzimmel kezeltük, etanollal kicsaptuk, majd 1000 egység bakterialis alkalikus foszfázzal kezeltük 68 °C hőmérsékleten 45 percig. Ezt a DNS-t fenol-kloroform elegyével háromszor extraháltuk, majd etanollal lecsaptuk. A defoszforilezett végeket ³²P-vel jeleztük egy 200 µCi [³²P] ATP-t és 10 egység T₄ polinukleotid-kinázt tartalmazó

20 µl reakcióelegyben. A plazmidot *SaII*-gyel vágtuk és 6%-os poliakrilamid-gélen futattuk.

A ³²P-jelzett inszertum-sávot elválasztottuk a géltől és kémiai lebontási módszerrel (52) szekvencia-vizsgálatnak vetettük alá. Ezen promoter-darab 3'-végén a DNS-szekvencia a várakozásnak megfelelő volt.

2. A 312 bp-os *PvuI*-*EcoRI* PGK promoter-fragment felépítése

25 µg pPGK-39 plazmidot (13. ábra) egyidejűleg kezeltünk 5–5 egység *SaII* és *XbaI* enzimmel, majd 6%-os gélen elektroforézisnek vetettük alá. A 39 bp-os promoter-darabot tartalmazó 390 bp sávot elektroelúció útján elkülönítettük. Az újra szuszpendált DNS-t *Sau3A*-val emésztettük majd 8%-os akrilamid-gélen elektroforizáltuk. A 39 bp-os PGK promoter- sávot elektroelúálással elkülönítettük. Ez a DNS 39 bázispárt tartalmazott a PGK promoter 5'-végéről egy *Sau3A*-*XbaI* fragmensen.

25 µg pB1-et *PvuI* és *KpnI* alkalmazásával emésztettük, majd 6%-os akrilamid-gélen elektroforizáltuk. A DNS 0,8 kbp sávját elektroelúció útján elkülönítettük, majd *Sau3A*-val emésztettük és 6%-os akrilamid-gélen elektroforizáltuk. A PGK promoter 265 bp sávját (11. ábra) elektroelúcióval elkülönítettük.

Ezt a DNS-t azután a fenti 39 bp promoter-fragmenttel ligáltuk szobahőmérsékleten 2 óra hossz-
 30 szat. A ligációs elegyet *XbaI* és *PvuI* alkalmazásával emésztettük, majd 6%-os akrilamid-gélen elektroforizáltuk.

A 312 bp *XbaI*-*PvuI* restriktációs fragmen elektroelúció útján elválasztottuk, majd hozzáadtuk egy 200 ng pBR322-t (41) (amelyet előzőleg különítettünk el és amelyből hiányzott a 162 bp *PvuI*-*PstI* restriktációs fragment) és 200 ng *XbaI*-*PstI* LeIF A cDNS gént (amelyet előzőleg különítettünk el 20 µg pLeIF trp A 25-ből) tartalmazó ligációs elegyhez. Ezt a három-faktoris ligációs elegyet használtuk fel az *E. coli* 294 törzs tetraciklin-rezisztenciára való transzfomálására. A transzfománs kolóniákat miniszkrineltük (44) és az egyik kolóniát (pPGK-300) elkülönítettük, ez 304 bázispárt a PGK 5'-szegélyező DNS-ből, a LeIF génhez kapcsolva egy pBR322-alapú vektorban. A LeIF A gén 5'-végének a következő szekvenciája van: 5'-CTAGAATTC-3'. Így a PGK promoter-fragmensből származó *XbaI* helynek e szekvenciába való fűzői lehetőséget nyújt egy *EcoRI* helynek az *XbaI* helyhez való hozzáadására. A pPGK-300 tehát tartalmazza a PGK-promoter egy részét egy *PvuI*-*EcoRI* fragmensben elkülönítve.

3. Egy 1500 bp *EcoRI*-*EcoRI* PGK promoter-fragment felépítése

10 µg pB1-t *PvuI* és *EcoRI* enzimmel kezeltünk és egy 6%-os akrilamid-gélen futattuk. A PGK 5'-szegélyező DNS-ből származó 1,3 kb *PvuI*-*EcoRI* DNS-sávot elektroelúálással elkülönítettünk. 10 µg pPGK-300-at *EcoRI* és *PvuI* enzimmel kezeltünk és a 312 bp promoter-fragmentet az így kapott enzimes kezelési reakcióelegy 6%-os akrilamid-gélen történő elektroforézise után elektroelúcióval elkülönítettük. 5 µg pFRL4-et *EcoRI*-vel hasítottunk, etanollal kicsaptuk, majd bakterialis alkalikus foszfázzal kezeltük 68 °C hőmérsékleten 45 percig. A kapott elegyet fenol kloroform elegyével háromszor extraháltuk, az így kapott DNS-t etanollal kicsaptuk, majd e vektor 200 ng-ját

20 ml vízben újból szuszpendáltuk és 100 ng 312 bp *EcoRI*-*PvuII* DNS-sel (pPGK-300-ból) és 100 ng *EcoRI*-*PvuII* DNS-sel (pB1-ből) kapcsoltuk. A ligációs elegyet használtuk fel ezután az *E. coli* 294 törzs ampicillin-rezisztenciára való transzformálására. A kapott transzformánsok egyike pPGK-1500 volt. Ez a plazmid az 1500 bp PGK promotor-fragmenst tartalmazza, a DNS *EcoRI*-*EcoRI* vagy *HindIII*-*EcoRI* darabjaként.

10 µg pPGK-1500-at *ClaI* és *EcoRI* enzimmel teljesen lebontottunk, majd az enzim lebontási reakcióelegyet 6%-os akrilamid-gélen elektroforézisnek vetettük alá. A PGK promotert tartalmazó 900 bp fragmenét elektroelúció útján elkülönítettük. 10 µg pIFN-γtrp 48-at *EcoRI* és *HincII* enzimmel teljesen lebontottunk és 6%-os akrilamid-gélen elektroforizáltuk. A közvetlen expresszióra alkalmas IFN-γ cDNS-t tartalmazó 938 bp sávot elektroelúció útján elkülönítettük a gélről.

Az élesztő expressziós vektort egy 3 faktort tartalmazó reakcióelegyen építettük fel, a PGK promotor-fragmen (egy *ClaI*-*EcoRI* darabon), a deléciós pFRM-31 és a fent leírt módon elkülönített IFN-γ cDNS ligációja útján. A ligációs reakcióelegyet 12 óra hosszat inkubáltuk 14 °C hőmérsékleten. Ezt a ligációs elegyet használtuk fel ezután az *E. coli* 294-törzs ampicillin-rezisztenciára való transzformálására. A transzformánsokat ezután vizsgáltuk, hogy jelen van-e bennük a helyesen felépített pPGK-IFN-γ expresszós plazmid (16. ábra). Az expressziós rendszert tartalmazó plazmidokat használtuk fel az RH218 élesztő-törzs szferoplasztjainak triptofán-prototrofiára való transzformálására triptofánt nem tartalmazó agarban. Ezeket a rekombináns élesztősejteket ezután rekombináns humán immuninterferon jelenlétére vizsgáltuk.

Az élesztőkivonatokat a következő módon állítottuk elő: YNB+CAA tápközegben 10 ml-es kultúrákat tenyésztettünk A660~1-2 eléréséig, majd a sejteket centrifugálással összegyűjtöttük és újból szuszpendáltuk 500 µl PBS pufferoldatban (20 mmól/l NaH₂PO₄, pH=7,4, 150 mmól/l NaCl). A szuszpenzióhoz ugyanolyan összetérfogatban üveggyöngyöket (0,45–0,5 mm átmérőjű) adunk, majd az elegyet 2 percig kevertetjük. Az így készített kivonatot 30 percig centrifugáljuk percnként 14 000 fordulattal, majd a szupernatáns folyadékot elkülönítjük és meghatározzuk benne az interferon-aktivitást, amely a citopátiás hatás gátlásán alapuló módszerrel mérve és IFN-α standarddal összehasonlítva 16 000 egység/ml volt.

M. A pSV 69 vektor sejt-kultúrájának felépítése

Az SV40-eredetű 342 bázispárt tartalmazó *HindIII*-*PvuII* fragmenst egy *EcoRI* restrikciós helyhez kötött fragmenssé alakítottuk át. A *HindIII* helyet egy 5'-dAGCTGAATTC szintetikus oligomer hozzáadása útján konvertáltuk, míg a *PvuII* helyet egy *EcoRI* helybe történő tompavég-ligáció útján és ennek betöltésére polimeráz I Klenow-fragmenst alkalmaztunk. Az így kapott *EcoRI* fragmenst a pML-1 *EcoRI* helyébe iktattuk be (28). Az amp^R géntől elfelé orientált SV40 késői promotert tartalmazó plazmidot ezután tovább módosítottuk a pML-1 amp^R génjéhez legközelebb eső *EcoRI* hely eltávolítása útján. (27).

A klónozott HBV DNS 1023 bázispárt tartalmazó *HpaI*-*BglII* fragmentjét (60) elkülönítettük és a hepatitisz-B vírus (HBV) *HpaI* helyét egy 5'-dGCGA-

ATTCGC szintetikus oligomer alkalmazásával egy *EcoRI* helyé alakítottuk át. Ezt az *EcoRI*-*BglII* kötött fragmentet közvetlenül klónoztuk az SV40-eredetű plazmid fent leírt *EcoRI*-*BamHI* helyeibe.

A fennmaradó *EcoRI* helyre azután az IFN-γ gént iktattuk be a p69 egy 1250 bázispárt tartalmazó *PstI* fragmentjén, a *PstI* végeknek *EcoRI* végekké való átalakítása után. Olyan klónokat különítettünk el, amelyekben az SV40 késői promotor megelőzte az IFN-γ szerkezeti génjét. A kapott plazmidokat azután szövettenyésztet sejtjeibe vezettük be (29) egy olyan módosított DEAE-dextrán módszer alkalmazásával, amelyben a DEAE-dextrán jelenlétében történő transzfekciót 8 óra hosszat folytattuk. A sejtkezeget 2–3 naponként cseréltük. 200 mikroliter kezeget vettünk el naponta biológiai interferon-meghatározás céljára. A transzfekció után 3 vagy 4 nappal a vizsgált mintákban általában 50–100 egység/ml interferont találtunk.

Az elemzési adatok azt mutatják, hogy a kifejezett-termékből hiányzik a rekombináns humán immuninterferon N-terminális CYS-TYR-CYS része (vö.: 5. ábra), továbbá, hogy egy szignál-peptid hasítás van a CYS-GLN kapcsolatnál (az 5. ábra szerinti 3. és 4. aminosavnál); ezek szerint úgy látszik, hogy az érett polipeptid ténylegesen 143 aminosavból áll.

N. A majomsejtekből kapott immuninterferon részleges tisztítása

Annak érdekében, hogy a majomsejtekből származó humán IFN-γ nagyobb mennyiségeit termelhesük, 10 darab 10 cm-es lemezen COS-7 sejtek friss egysejt-rétegeit fertőztük át összesen 30 µg pDLIF3-mal 110 ml DEAE-dextrános közegben, amely 200 µg/ml DEAE-dextránt (molekulatömeg: 500 000) és 0,05 mó/l 7,5 pH-értékű triszt tartalmazott DMEM-ben. 37 °C hőmérsékleten lefolytatott 16 órai inkubálás után a lemezeket DMEM-mel kétszer mostuk. 10% borjúembriószérumot (FBS) 2 mmól/l glutamint. 50 µg/ml G-penicillint és 50 mg/ml sztreptomocint tartalmazó 15 ml friss DMEM-et adtunk azután mind egyik lemezhez. A következő napon a kezeget szérummentes DMEM-re cseréltük ki, majd minden nap szérummentes kezeget adtunk a lemezekhez. A kezegeket összegyűjtöttük és 4 °C hőmérsékleten tároltuk az elemzésig illetőleg a szabályozott porúsú üveghöz (CPG) való kötésig. A transzfekció után 3 és 4 nappal kivett minták összegyűjtött frakcióit megelemezve azt találtuk, hogy lényegileg valamennyi minta tartalmazott aktivitást.

100 ml sejt-szupernatánshoz 0,5 g aprószemcséjű szabályozott porúsú üveget (CPG 350, az Electro-nucleonics cég gyártmánya, szita finomság 120/200) adtunk és az elegyet 4 °C hőmérsékleten 3 óra hosszat kevertettük, majd rövid ideig centrifugáltuk egy asztali centrifugában. A leülepedett üveggyöngyöket egy oszlopra vittük és alaposan mostuk egy 20 mmól/l nátrium-foszfátot, 1 mó/l nátrium-kloridot és 0,1% béta-merkaptó-etanolt tartalmazó, pH=7,2 értékű puffer oldattal. Az aktivitást azután ugyanilyen, de 30% etilén-glikolt is tartalmazó pufferoldattal eluáltuk, majd ugyanilyen, de 50% etilén-glikolt tartalmazó pufferoldattal folytattuk az eluálást. Az aktivitás lényegileg teljesen a szabályozott porúsú üveggyöngyhöz volt kötve; az eluálás során az eluált aktivitás

75%-a a 30% etilénlikolt tartalmazó pufferoldattal eluált frakciókban jelent meg. Ezeket a frakciókat egyesítettük és egy 20 mmól/l nátrium-foszfátot és 1 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó, pH=7,2 értékű pufferoldattal 10% etilénlikol-koncentrációra hígítottuk és közvetlenül felvittük egy 10 ml Con A Sepharose adszorbenst (Pharmacia) tartalmazó oszlopra. Az oszlopot a 20 mmól/l nátrium-foszfátot és 1 mól/l nátrium-kloridot tartalmazó, pH=7,2 értékű pufferrel alaposan mostuk, majd az aktivitást a fentivel egyező, de 0,2 mól/l α -metil-D-mannozidot is tartalmazó pufferoldattal eluáltuk. Az aktivitás számottevő része (55%) nem kötődött ehhez a lektinhez. Az aktivitás 45%-a eluálódott α -metil-D-mannoziddal.

Gyógyszerkészítmények

A találmány szerinti eljárással előállított termékekből a szakmabeliek által jól ismert módszerekkel készíthetünk gyógyászati célokra felhasználható készítményeket; ennek során a találmány szerint előállított humán immuninterferon terméket gyógyászati szempontból elfogadható vívmányokkal keverjük össze. Az ilyen célra alkalmas vívmányokra és felhasználásuk módjaira vonatkozólag utalunk például E. W. Martin: Remington's Pharmaceutical Sciences c. munkára. Az ilyen készítmények a találmány szerinti eljárással előállított interferon-fehérje hatásos mennyiségeit tartalmazhatják, alkalmas vívmányokkal elegyítve, oly módon, hogy a készítmények megfelelő módon adagolhatóak legyenek a gyógyászati kezelést igénylő személyeknek.

A. Parenterális beadásra szolgáló készítmények

A humán immuninterferon parenterális úton adható be tumorelleses vagy vírusellenes gyógykezelést igénylő vagy immunosuppresszív állapotokat mutató betegeknek. Az adagolás és a beadás módja hasonló lehet a klinikai vizsgálatokra jelenleg alkalmazott másfajta humán interferonokéhoz, így például naponta körülbelül 1×10^6 – 10×10^6 egység, 1%-nál nagyobb tisztasági fokú anyagok esetében pedig például 50×10^6 egységig is emelkedhet a napi adag. A találmány szerinti eljárással előállított IFN- γ -adagjai a hatás fokozása céljából még számottevő mértékben tovább is növelhetők, minthogy ebből a termékéből lényegileg hiányoznak az olyan egyéb humán fehérjék, amelyek

embereknek beadva nem kívánatos mellékhatásokat okozhatnak.

A lényegileg homogén IFN- γ parenterális úton beadható adagjának példaként 3 mg 2×10^8 egység/mg specifikus aktivitású IFN- γ -t 25 ml 5 N humán szérumban oldhatunk (gyógyszerkönyvi minőségű szérumban alkalmazva erre a célra), az oldatot egy bakteriológiai szűrőn átszűrjük, majd a leszűrt oldatot aseptikus módon 100 ampullába osztjuk szét; ily módon egy-egy ampullában 6×10^6 egység tiszta interferont kapunk parenterális beadásra alkalmas készítmény alakjában. Az így ampullázott készítményt, célszerűen hidegen, -20°C hőmérsékleten tároljuk felhasználásig.

A készítmény biológiai értékmérése

A. A vírusellenes aktivitás jellemzése.

Antitest-semlegesítés céljaira a mintákat a szükséghez képest 500–1000 egység/ml koncentrációra hígítjuk foszfát-puffer sóoldat és marhaszérumban (PBS-BSA) elegyével. Egyenlő térfogatú mintákat 2–12 óra hosszat inkubálunk 4°C hőmérsékleten, nyúl antihumán-leukocita, fibroblaszt vagy immuninterferon antiszérumban hígítás-sorozatával. Az ennek során alkalmazott anti-IFN- α és - β a National Institute of Allergy and Infectious Diseases intézet terméke volt. Az anti-IFN- γ -t 5–20%-os tisztaságú autentikus IFN- γ -ból állítottuk elő; ez utóbbit stimulált perifériális vér-limfocitákból nyertük és tisztítottuk. A mintákat a vizsgálat előtt 3 percig centrifugáltuk 12 000 g-vel. A készítmény pH=2 értéken mutatott stabilitásának vizsgálata céljából a mintákat 1N sósavoldattal pH=2 értékre állítottuk be, majd 4°C hőmérsékleten 2–12 óra hosszat inkubáltuk és a mérés előtt 1N nátrium-hidroxid-oldattal semlegesítettük őket. A nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) szembeni érzékenység vizsgálata céljából a mintákat azonos térfogatú 0,2%-os SDS-oldattal inkubáltuk 4°C hőmérsékleten 2–12 óra hosszat, majd ezután vetettük őket alá mérésnek.

B. Az E. coli és COS-7 sejtek által termelt IFN-jellemzése

Az IFN- α , IFN- β és IFN- γ standard minták különböző kezelése után mutatott jellemző viselkedésének adatait az alábbi táblázatban foglaltuk össze:

Vírusellenes aktivitás (egység/ml)

Kezelés	IFN α	IFN β	IFN γ	E. coli W3110/ pIFN- γ trp48 kivonat	COS-7 sejt/ pSV γ 69 szuper- natáns
Kezeletlen	375	125	250	250	62,5
pH=2	375	125	<6	<12	<4
0,1% SDS	375	–	<4	<8	–
nyúl anti-IFN- α	<8	125	250	250	187
nyúl anti-IFN- β	375	<8	187	250	125
nyúl anti-IFN- γ	375	125	<4	<8	<4

Amint a fenti táblázat adataiból látható, az *E. coli* W3110/pIFN- γ trp 48 és a COS-7/pSV γ 69 által termelt interferon-aktivitás savérzékeny, SDS-érzékeny és az immuninterferon-antiszérum semlegesíti. Az IFN- α és IFN- β antitestek nem semlegesítik. Ezek az adatok tehát megerősítik, hogy a fent leírt rendszer által termelt hatóanyagok immun interferonok, továbbá, hogy a p69 plazmid cDNS inszertum az IFN- γ -t kódolja.

A termék tisztítása

Az IFN- γ szennyezősektől, például baktériumoktól való tisztításának egy lehetséges módját az alábbi általános eljárás-vázlat szemlélteti:

1. A sejtek extrakciója nagy vezetőképességű lízis-pufferoldatban (körülbelül 8 pH-értéken), egy homogenizátoron nagy nyomáson történő átvezetése, majd a távozó folyadék jégfürdőben történő lehűtése útján.

2. A DNS kicsapása a polietilén-iminnel keverés közben, például 4 °C hőmérsékleten,

3. A baktérium-fehérjék lecsapása a pH-érték módosítása útján, az IFN- γ ezúttal is oldatban marad.

4. A szilárd részek elkülönítése 4 °C hőmérsékleten történő centrifugálással.

5. A szupernatáns betöményítése (a pH-érték újbóli beállítása után) például ultraszűrővel.

6. A koncentrátum dialízise kis vezetőképességű pufferoldattal szemben.

7. A szilárd részek eltávolítása centrifugálással; az IFN- γ ezúttal is oldatban marad.

8. Ioncsere-lő-kromatográfia karboximetil-cellulózra; eluálás növekvő ionerősségű grádienssel.

9. Kromatografálás kalcium-foszfát-gélen; eluálás növekvő ionerősségű grádienssel.

10. Ioncsere-lő kromatográfia karboximetil-cellulózra gyengén denaturáló körülmények között; eluálás növekvő ionerősségű grádienssel.

11. Elválásztás géliszűrő kromatográfiával.

A fenti tisztítási eljárás alkalmazásával 95%-ot meghaladó tisztaságú terméket állíthatunk elő.

A találmány szerinti eljárással előállított immuninterferon fehérjét meghatározott DNS-gén és indukció aminosav-szekvencia meghatározás alapján definiáltuk (vö.: 5. ábra). A szakemberek számára nyilvánvaló, hogy az itt konkrétan leírt interferon esetében természetes allél variációk létezhetnek és ilyenek egyéni különbségekkel elő is fordulnak. Ezek a variációk az általános szekvenciában mutakozó aminosav-különbségekben, deléciókban, szubsztitúciókban, inszerciókban, inverziókban, egy vagy több aminosav hozzáadásában nyilvánulhatnak meg. Az összes ilyen allél variációk is a jelen találmány körébe esnek.

A találmány lényege ugyanis a rekombináns DNS-technológia alkalmazása különféle humán IFN- γ -származékok előállítására; ezek különbözőképpen módosíthatók egy vagy több aminosav-szubsztitúció, deléció, addíció vagy más aminosavval való kicserélés útján. Mindezek a módosulatok a humán IFN- γ oly változatai, amelyek a jellemző humán IFN- γ aktivitást mutatják és így ezek előállítása egyaránt a jelen találmány tárgykörébe tartozik. A jelen leírásban konkrétan ismertetett DNS-t és aminosav-szekvenciát tartalmazó IFN- γ (vö.: 5. ábra) előállítási eljárásának

legelőnyösebb reprodukálási módja kétségtelenül a teljes gén szintetikus úton történő előállítása – erre vonatkozólag vö. például a (26) alatt idézett irodalmat –, de eljárhatunk oly módon is, hogy szintetikus dezoxi- oligonukleotidokat állítunk elő, amelyekkel a cDNS-forrás szondázható abból a célból, hogy a standard hidridizációs módszerekkel különítsük el a gént. Ha a kívánt IFN- γ fehérjét kódoló nukleotid-szekvencia már egyszer rendelkezésre áll, az IFN- γ nagy tisztaságban történő előállításához szükséges expressziós, elkülönítési és tisztítási műveleteket a fenti leírásban ismertetett módon folytathatjuk le.

Bár a jelen leírásban a találmány szerinti eljárás különlegesen előnyös kiviteli módjaira utaltunk, nyilvánvaló, hogy a találmány köre nem korlátozódik ezekre a különösen előnyös módzatokra; a találmány körét természetesen a fenti igénypontok határozzák meg.

Idézett irodalom

1. Goeddel etc., *Natura* 287, 411 (1980).
2. Goeddel etc., *Nature* 290, 20 (1981).
3. Yelverton etc., *Nucleic Acids Research* 9, 731 (1981).
4. Gutterman etc., *Annals of Int. Med.* 93, 399 (1980).
5. Goeddel etc., *Nucleic Acids Research* 8, 4057 (1980).
6. Yip etc., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 78, 1601 (1981).
7. Taniguchi etc., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 78, 3469 (1981).
8. Bloom, *Nature* 289, 593 (1980).
9. Sonnenfeld etc., *Cellular Immunol.* 40, 285 (1978).
10. Fleishman etc., *Infection and Immunity* 26, 248 (1979).
11. Blalock etc., *Cellular Immunology* 49, 390 (1980).
12. Rudin etc., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77, 5928 (1980).
13. Crane etc., *J. Natl. Cancer Inst.* 61, 871 (1978).
14. Stinchcomb etc., *Nature* 282, 39 (1979).
15. Kingsman etc., *Gene* 7, 141 (1979).
16. Tschumper etc., *Gene* 10, 157 (1980).
17. Mortimer etc., *Microbiological Reviews* 44, 519 (1980).
18. Miozzari etc., *Journal of Bacteriology* 134, 48 (1978).
19. Jones, *Genetics* 85, 23 (1977).
20. Hitzeman etc., *J. Biol. Chem.* 255, 12073 (1980).
21. Hess etc., *J. Adv. Enzyme Regul.* 7, 149 (1968).
22. Holland etc., *Biochemistry* 17, 4900 (1978).
23. Bostian etc., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77, 4504 (1980).
24. *The Molecular Biology of Yeast* (1981. Aug. 11–18.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
25. Chambon, *Ann. Rev. Biochemistry*, 44, 613 (1975).
- 25a. Glzman, *Cell* 23, 175 (1981).
26. Goeddel etc., *Nature* 281, 544 (1979).
27. Itakura etc., *Science* 198, 1056 (1977).

28. Lusky etc., *Nature* 293, 79 (1981).
 29. Glzman etc., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 44, 293 (1980).
 30. Fiers etc., *Nature* 273, 113 (1978).
 31. Reddy etc., *Science* 200, 494 (1978).
 32. Boedtker etc., *Prog. in Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 19, 253 (1976).
 33. Berger etc., *Biochemistry* 18, 5143 (1979).
 34. Aviv etc., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 1408 (1972).
 35. Gurdon etc., *J. Molec. Biol.* 80, 539 (1975).
 36. Stewart, *The Interferon System*. Springer, New York, 13-26 old. (1979).
 37. Lehrach etc., *Biochemistry* 16, 4743 (1977).
 38. Lynch etc., *Virology* 98, 251 (1979).
 39. Wickens etc., *J. Biol. Chem.* 253, 2483 (1978).
 40. Chang etc., *Nature* 275, 617 (1978).
 41. Bolivar etc., *Gene* 2, 95 (1977).
 42. Grunstein etc., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3961 (1975).
 43. Fritsch etc., *Cell* 19, 959 (1980).
 44. Birnboim etc., *Nucleic Acids Res.* 7, 1513 (1979).
 45. Kafatos etc., *Nucleic Acids Res.* 7, 1541 (1979).
 46. Clewell etc., *Biochemistry* 9, 4428 (1970).
 47. Taylor etc., *Biochim. Biophys. Acta* 442, 324 (1976).
 48. Smith, *Methods Enzymol.* 65, 560 (1980).
 49. Messing etc., *Nucleic Acids Res.* 9, 309 (1981).
 50. Winzler, *Hormonal Proteins and Peptides* (szerk. Li), Academic Press, New York, p. 1 (1973).
 51. Nathan etc., *Nature* 292, 84- (1981).
 52. Maxam etc., *Methods in Enzymol.* 65, 490 (1980).
 53. Crea etc., *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 75, 5765 (1978).
 54. Southern, *J. Molec. Biol.* 98, 503 (1975).
 55. Blin etc., *Nucleic Acids Res.* 3, 2303 (1976).
 56. Lawn etc., *Science* 212, 1159 (1981).
 57. Lawn etc., *Nucleic Acids Res.* 9, 1045 (1981).
 58. Miller, *Experiments in Molecular Genetics*, p. 431-3, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York (1972).
 59. Beggs, *Nature* 275, 104 (1978).
 60. Valenzuela etc., *Animal Virus Genetics* (szerk. Fields, Jaenisch és Fox) p. 57, Academic Press, New York (1980).
 61. McCuthan etc., *J. Natl. Cancer Inst.* 41, 351 (1968).

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

- Eljárás rekombináns humán gamma- vagy immuninterferon előállítására, *azzal jellemezve*, hogy emberi szövetből mRNS-t nyerünk ki vagy ilyent szintetizálunk az mRNS-ből cDNS könyvtárat készítünk, ezt megfelelő plazmidba iktatjuk, és ezt a plazmidot valamely alkalmas bakteriumba, előnyösen *E. coli*-ba transzformálva transzformánsokat készítünk, a transzformánsokat radioaktív vizsgáló mintával (próbával) átvizsgáljuk, a hibridizáló telepekből plazmidokat készítünk, ezek cDNS-ének szerkezetét megvizsgáljuk, az immuninterferon tulajdonságainak megfelelő polipeptidet kódoló cDNS-t magában foglaló plazmidot kiválasztjuk, ebből a humán immuninterferont kódoló DNS-szakaszt elkülönítjük és megfelelő szabályozó rendszerrel rendelkező vektorba iktatjuk, a vektort megfelelő baktérium törzsbe, élesztőtörzsbe vagy állati szövettenyészetbe transzformáljuk, a transzformánsokat megfelelő tápközegben tenyésztjük, és a tenyészetből a humán immuninterferont kinyerjük.
- Eljárás a

1 10
 CYS TYR CYS GLN ASP PRO TYR VAL LYS GLU ALA GLU ASN
 20
 LEU LYS LYS TYR PHE ASN ALA GLY HIS SER ASP VAL ALA
 30
 ASP ASN GLY THR LEU PHE LEU GLY ILE LEU LYS ASN TRP
 40 50
 LYS GLU GLU SER ASP ARG LYS ILE MET GLN SER GLN ILE
 60
 VAL SER PHE TYR PHE LYS LEU PHE LYS ASN PHE LYS ASP
 70
 ASP GLN SER ILE GLN LYS SER VAL GLU THR ILE LYS GLU
 80 90
 ASP MET ASN VAL LYS PHE PHE ASN SER ASN LYS LYS LYS
 100
 ARG ASP ASP PHE GLU LYS LEU THR ASN TYR SER VAL THR
 110
 ASP LEU ASN VAL GLN ARG LYS ALA ILE HIS GLU LEU ILE
 120 130
 GLN VAL MET ALA GLU LEU SER PRO ALA ALA LYS THR GLY
 140
 LYS ARG LYS ARG SER GLN MET LEU PHE ARG GLY ARG ARG
 146
 ALA SER GLN

szekvenciájú, humán gamma- vagy immuninterferon polipeptidet kódoló DNS szekvencia előállítására, *azzal jellemezve*, hogy

a) emberi szövetből mRNS-t nyerünk ki, ebből az mRNS-ből cDNS könyvtárat készítünk, ezt megfelelő plazmidba iktatva, és ezt a plazmidot valamely baktériumba, előnyösen E. coli-ba transzformálva transzformánsokat készítünk, a transzformánsokat radioaktív vizsgáló mintával (próbával) átvizsgáljuk, a hibridizáló telepekből plazmidokat készítünk, ezek cDNS-ének szerkezetét megvizsgáljuk, és a tárgyi kör szerinti szerkezetnek megfelelő polipeptidet kódoló plazmidot, előnyösen a p69 plazmidot kiválasztjuk, és ebből a humán immuninterferont kódoló DNS szakaszt elkülönítjük, vagy

b) a tárgyi körben megadott aminosav-szekvenciának megfelelő DNS szakaszt vegyi úton szintetizáljuk.

3. Eljárás a 2. igénypontban megadott szekvenciájú humán immuninterferont kódoló DNS szekvenciát tartalmazó vektor előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely 2. igénypont szerinti DNS szakaszt a megfelelő szabályozó rendszerrel rendelkező vektorba iktatjuk.

4. A 3. igénypont szerinti eljárás a humán immuninterferont kódoló DNS szekvenciát tartalmazó, E. coliban replikálódni képes pIFN- γ trp48 plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy p69 plazmidot PstI-gyel és BstNI-gyel emésztünk, az N-terminális első 5 aminosavát kódoló DNS-en belül a DNS szekvenciát elhasítjuk, majd szintetikus DNS-t építünk az N-terminális végre olyan módon, hogy az eredeti N-terminális kódoló vég helyreálljon, és ezen kívül még egy MET kód is legyen az N-terminális végén, és az így kapott plazmidot EcoRI-gyel és PstI-gyel hasított pLEIF A trp 103 plazmidba építjük, és a pIFN- γ trp48 plazmidot kinyerjük.

5. A 3. igénypont szerinti eljárás a humán immuninterferont kódoló DNS szekvenciát tartalmazó, élesztőben replikálódni képes pPGK-IFN- γ plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy IFN- γ trp48 plazmidot, EcoRI-gyel emésztett pFRM31 plazmidot és ClaI-gyel, valamint EcoRI-gyel emésztett pPGK-1500 plazmidot ligálunk, és a pPGK-IFN- γ plazmidot kinyerjük.

6. A 3. igénypont szerinti eljárás a humán immuninterferont kódoló DNS szekvenciát tartalmazó, állati szövettenyésztésben replikálódni képes pSV 69 plazmid előállítására, *azzal jellemezve*, hogy SV40 origót magában foglaló EcoRI restrikciós fragmentumot pML-1 plazmidba iktatjuk, az így létrejött plazmidba HBV bázispárokat tartalmazó fragmentumot iktatunk, az így létrejött plazmidban p69 plazmidból eredő IFN- γ -gént iktatunk, és így a pSV 69 plazmidot nyerjük.

7. Eljárás a 2. igénypontban megadott szekvenciájú humán immuninterferont kódoló DNS szekvenciát tartalmazó transzformáns E. coli vagy élesztő törzs, vagy állati szövettenyésztet előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely 3. igénypont szerinti vektort E. coli, vagy élesztő törzsbe, vagy állati szövetsejtbe transzformálunk.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás a 2. igénypontban megadott szekvenciájú humán immuninterferont kódoló DNS szekvenciát tartalmazó transzformáns E. coli törzs előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely E. coli törzset a 4. igénypont szerinti pIFN- γ -trp48 plazmiddal transzformálunk.

9. A 7. igénypont szerinti eljárás a 2. igénypontban megadott szekvenciájú humán immuninterferont kódoló DNS szekvenciát tartalmazó transzformáns élesztőtörzs előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely élesztőtörzset az 5. igénypont szerinti pPGK-IFN plazmiddal transzformálunk.

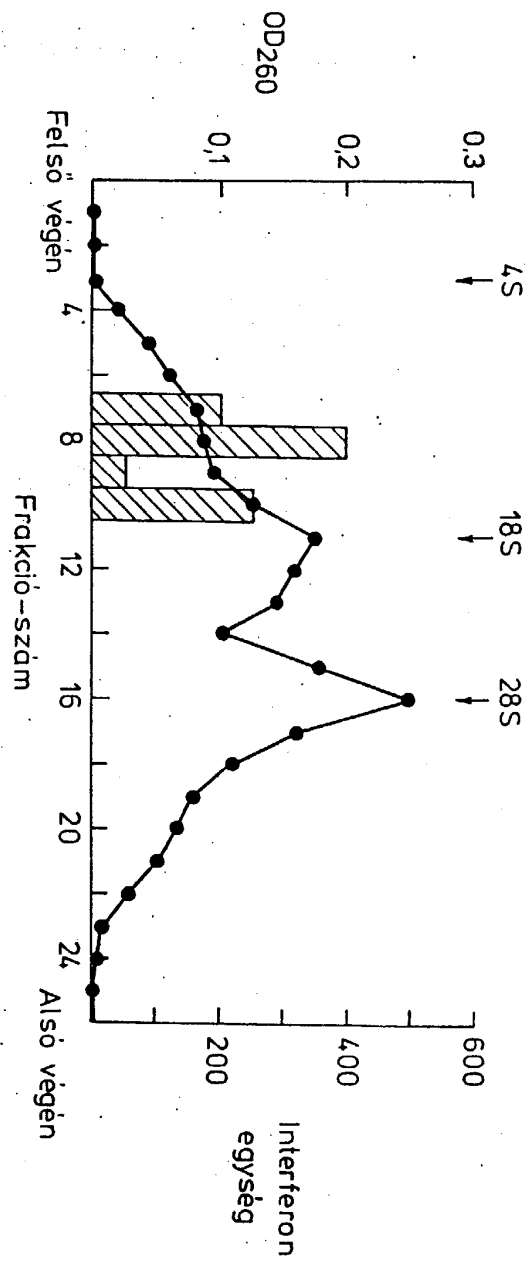
10. A 7. igénypont szerinti eljárás a 2. igénypontban megadott szekvenciájú humán immuninterferont kódoló DNS szekvenciát tartalmazó transzformáns állati szövetsejt előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely állati szövetsejtet a 6. igénypont szerinti pSV 69 plazmiddal transzformálunk.

11. Eljárás a 2. igénypontban megadott szekvenciájú humán immuninterferon, illetve N-terminálisán CYS-TYR-CYS aminosavszekvenciát nélkülöző származéka előállítására, *azzal jellemezve*, hogy a 7-10. igénypontok bármelyike szerinti transzformáns E. coli vagy élesztősejtet vagy állati szövetsejtet megfelelő tápközegben tenyésztjük, és a tenyésztetből transzformáns E. coli és élesztősejtek tenyésztése eseténben a 2. igénypontban megadott szekvenciájú polipeptidet, illetve az állati szövetsejtek tenyésztése esetében ennek CYS-TYR-CYS aminosavszekvenciát nélkülöző származékát kinyerjük.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás a 2. igénypontban megadott szekvenciának N-terminálisán CYS-TYR-CYS aminosavszekvenciát nélkülöző származékát jelentő humán gamma interferon előállítására, *azzal jellemezve*, hogy valamely 7. vagy 10. igénypont szerinti transzformáns állati szövetsejtet megfelelő tápközegben tenyésztünk, és a tárgyi körben jellemzett szekvenciájú humán gamma interferont kinyerjük.

13. Eljárás a rekombináns humán gamma interferont tartalmazó immun-szabályozó gyógyszerkészítmény előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az 1., 11. és 12. igénypontok bármelyike szerint előállított rekombináns humán gamma interferont gyógyszeratílag elfogadható segédanyagokkal gyógyszerati készítménnyé keverjük.

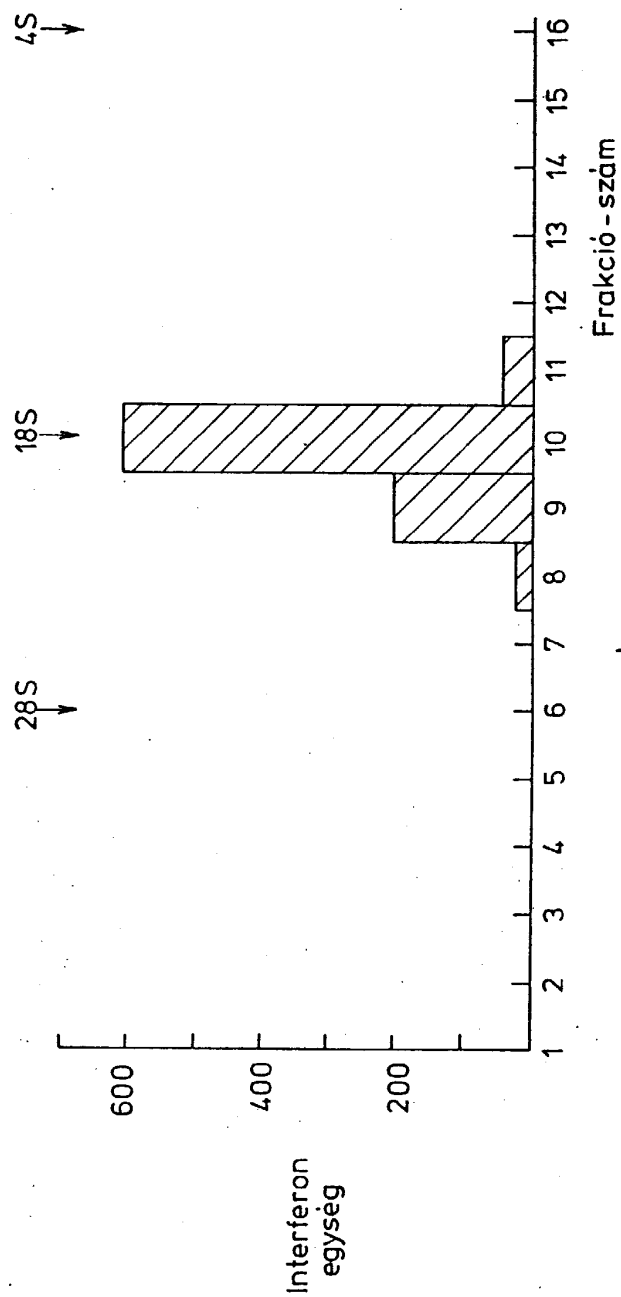
DENATURÁLÓ SZACHARÓZ - GRÁDIENS 5-25 % SZACHARÓZ 70% FORMAMIDBAN



1. ábra

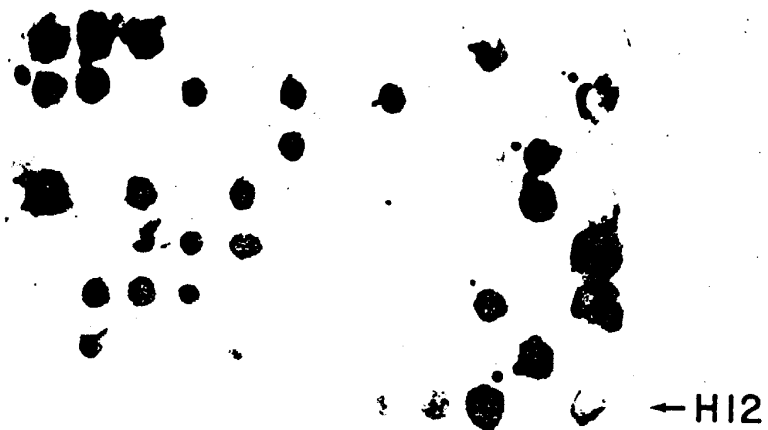
POLÍ A + RNS GÉL ELEKTROFÓRÉZISE

1,75% AGARÓZ 6 MOL/1 KARBAMID - OLDATBAN

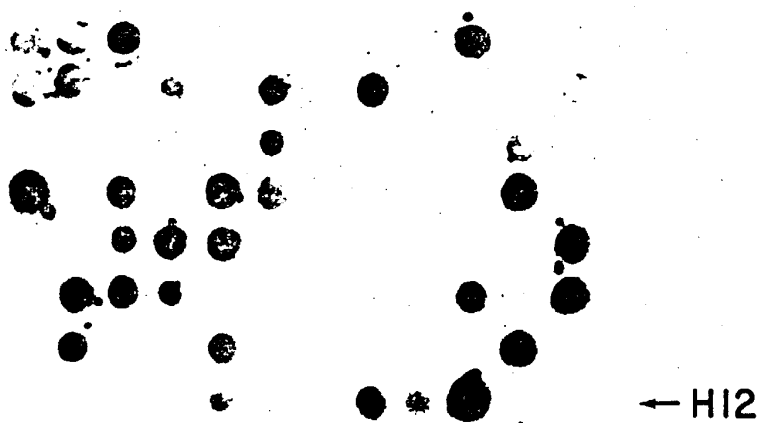


2. ábra

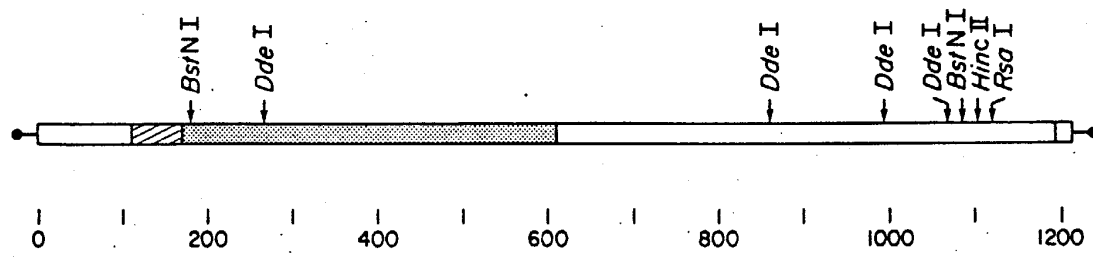
Indukált ^{32}P -cDNS próba



Indukálatlan ^{32}P -cDNS próba



3. ábra



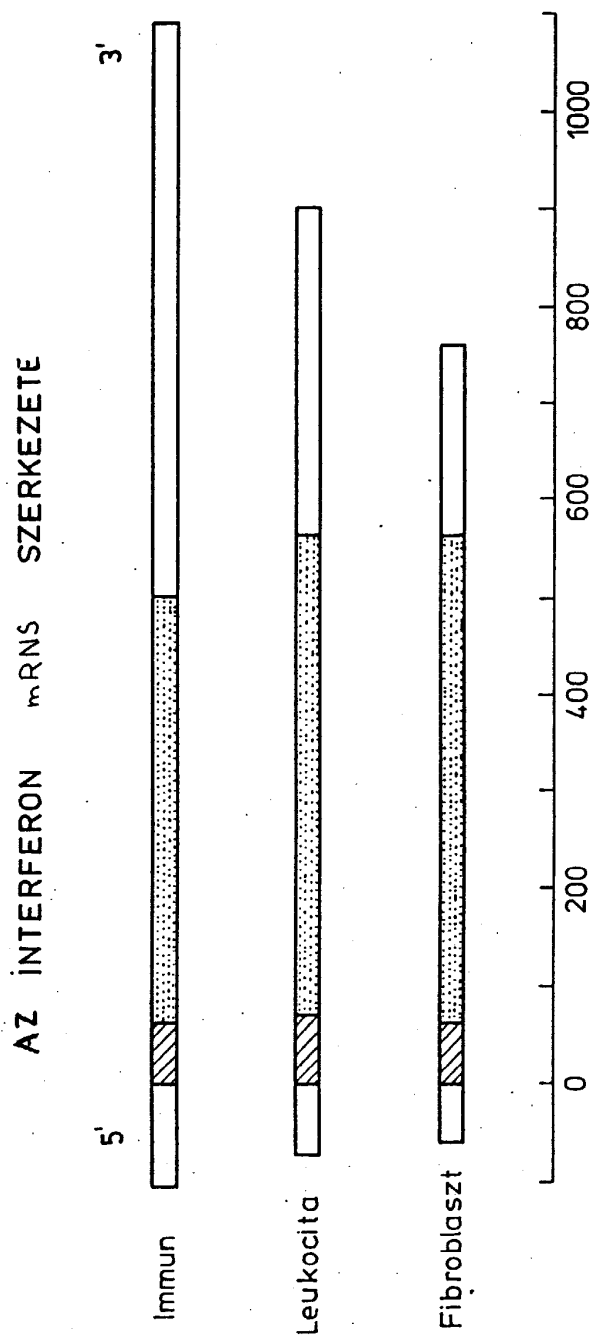
4. ábra

5' 31
TGAAGATCAGCTATTAGAAGAGAAAGATCAGTTAAGTCCTTTGGACCTGATCAGCTTGATACAAGAACTACTGATTCAACTCTTTGGCTTAATTCTCTGGGAACG ATG AAA TAT
30 100
thr ser tyr ile leu ala phe gln leu cys ile val leu gly ser leu gly cys tyr cys gln asp pro tyr val lys glu ala glu asn
aca agt tat atc ttg gct ttt cag ctg tgc atc gtt ttg ggt tct ctt gcc tgt tac tgc cag gac cca tat gta aaa gaa gca gaa aac
150 200
20 30 40
leu lys lys tyr phe asn ala gly his ser asp val ala asp asn gly thr leu phe leu gly ile leu lys asn trp lys glu glu ser
ctt aag aaa tat ttt aat gca ggt cat tca gat gta gcg gat aat gga act ctt ttc tta gcc att ttg aag aat tgg aaa gag gag agt
250
50 60 70
asp arg lys ile met gln ser gln ile val ser phe tyr phe lys leu phe lys asn phe lys asp asp gln ser ile gln lys ser val
gac aga aaa ata atg cag agc caa att gtc tcc ttt tac ttc aaa ctt ttt aaa aac ttt aaa gat gac cag agc atc caa aag agt gtg
300 350
80 90 100
glu thr ile lys glu asp met asn val lys phe phe asn ser asn lys lys lys arg asp phe phe glu lys leu thr asn tyr ser val
gag acc atc aag gaa gac atg aat gtc aag ttt ttc aat agc aac aaa aag aaa cga gat gac ttc gaa aag ctg act aat tat tgc gta
400 450
110 120 130
thr asp leu asn val gln arg lys ala ile his glu leu ile gln val met ala glu leu ser pro ala ala lys thr gly lys arg lys
act gac ttg aat gtc caa cgc aaa gca ata cat gaa ctg atc caa gtg atg gct gaa ctg tgc cca gca gct aaa aca ggg aag cga aaa
500 550
140 146 STOP
arg ser gln met leu phe arg gly arg arg ala ser gln
agg agt cag atg ctg ttt cga ggt cga aga gca tcc cag taa tgggtgctgctgctgcaatatttgaaattttaaatctaaatctatttattaatatttaacatta
600 650
700 750
tttatatggggaatatatttttagactcatcaatcaaatagattttataatagcaactttttgtgtaatgaaatgaatatctattataatgtattatttataaattccatatcctg
800 850 900
tgactgtctcacttaattcctttgtttctgactaattaggaaggctatgtgattacaggcctttatctcaggggcccaactagccagcccaacctaaagcagatcccatggtgtgtgtt
950 1000
tatttcacttgatgatacaatgaacacttataagtgaaagtatactcagttactgcccgttgaaatagctgcaactgagccagtgcttttaatggcatgtcagacagaactt
1050 1100
gaatgtgtcaggtgacctgatgaaaacatagcatctcaggagatttcagcctgctgtccaaatatgttgacacactgtgactgtaccctgaaatggaaagtaactcatttgttaaaa
1150 1200
ttatcaatatctaatatatatgaataaagtgtagttcacaactaaaaaaaaaaaaaaaaa
1250

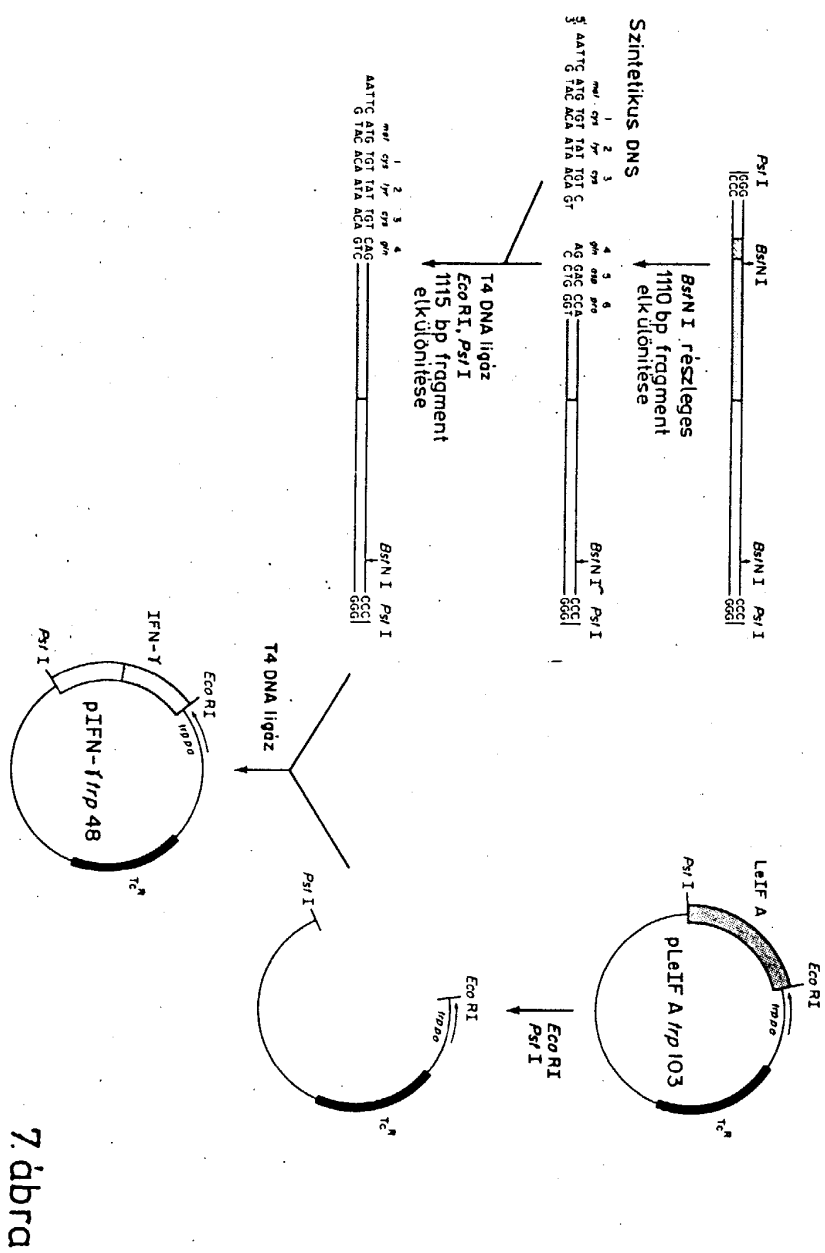
3'

0184M

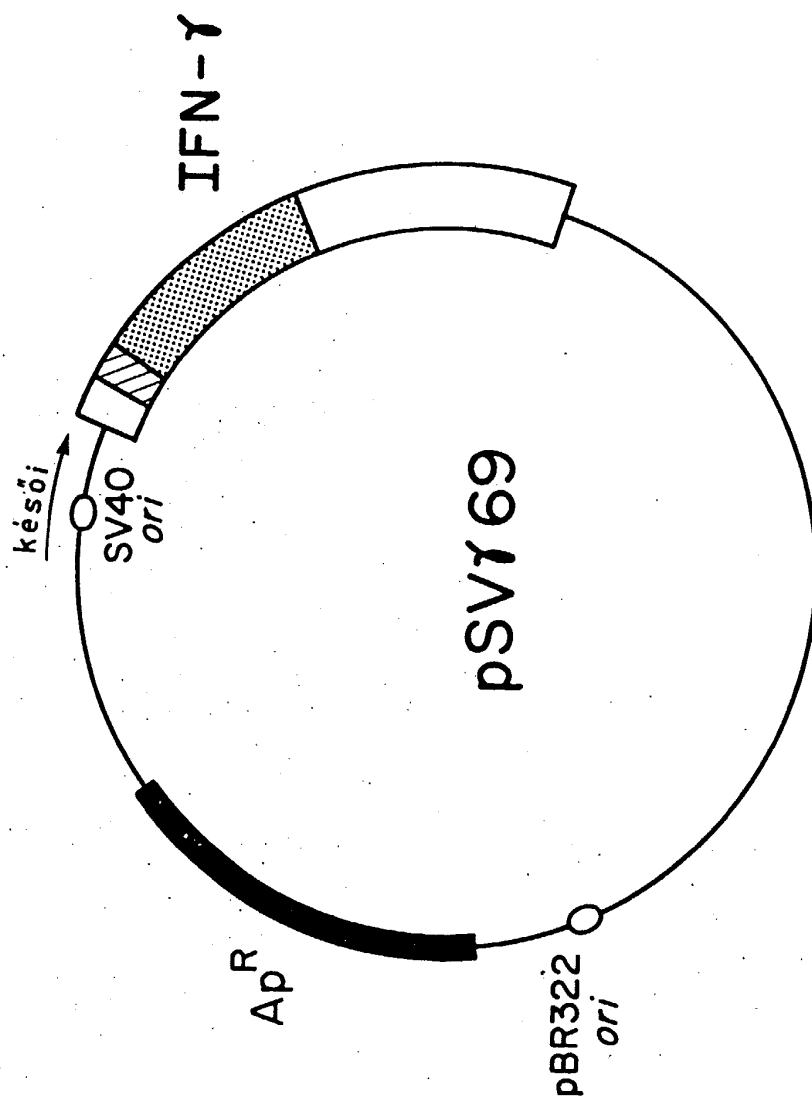
5. abra



6. ábra



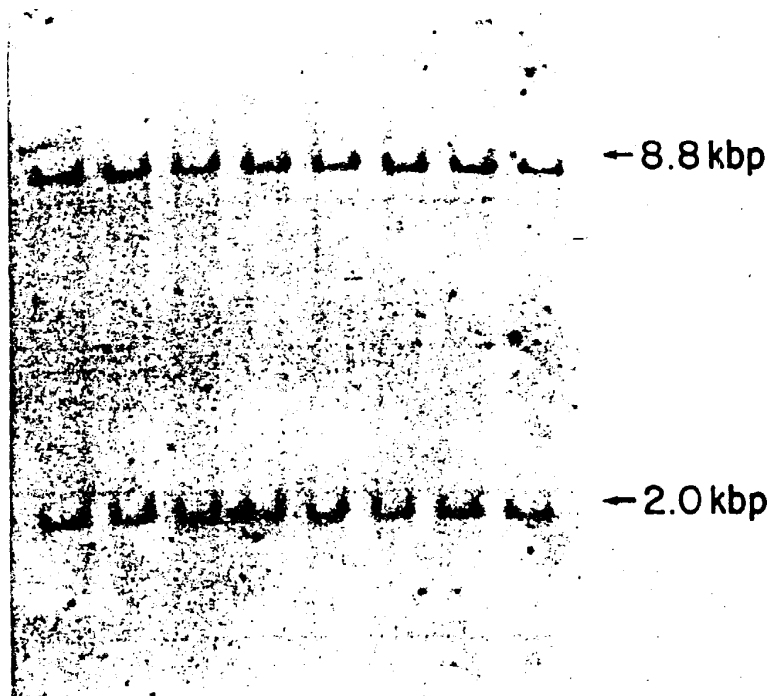
7. ábra



8. ábra

SOUTHERN HÍBRIDIZÁCIÓ

8 KÜLÖNBÖZŐ HUMAN GENOM – DNS EcoRI ENZIMES
LEBONTÁSA KLÓN 69 PRÓBÁVAL SZEMBEN

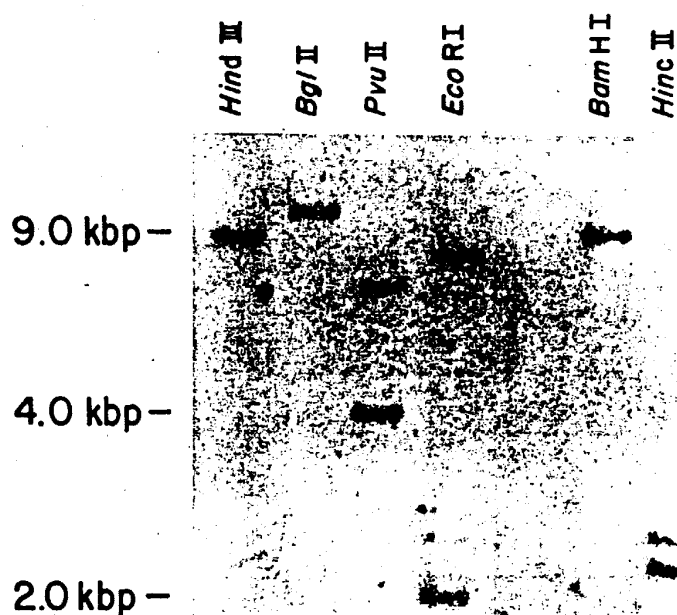


9. ábra

SOUTHERN HÍBRIDIZÁCIÓ

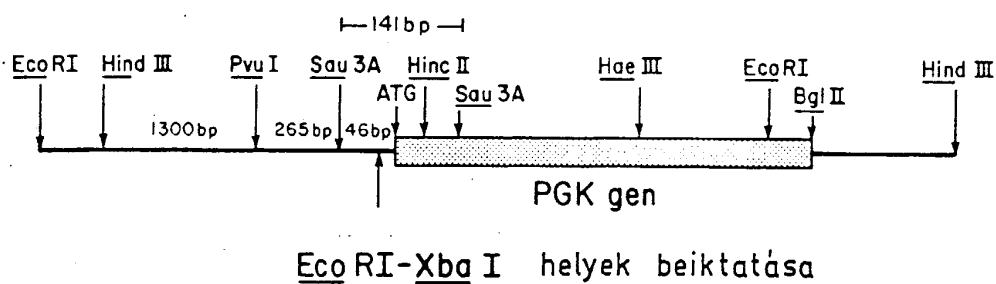
HUMAN GENOM - DNS ENZIMES LEBONTÁSA

KLON 69 PRÓBÁVAL SZEMBEN



10. ábra

EGY EcoRI HELY BEIKTATÁSA ÉLESZTŐ 3-FOSZFOGLICERÁT
GENJÉNEK 5'-SZEGELYEZŐ DNS-ÉBE

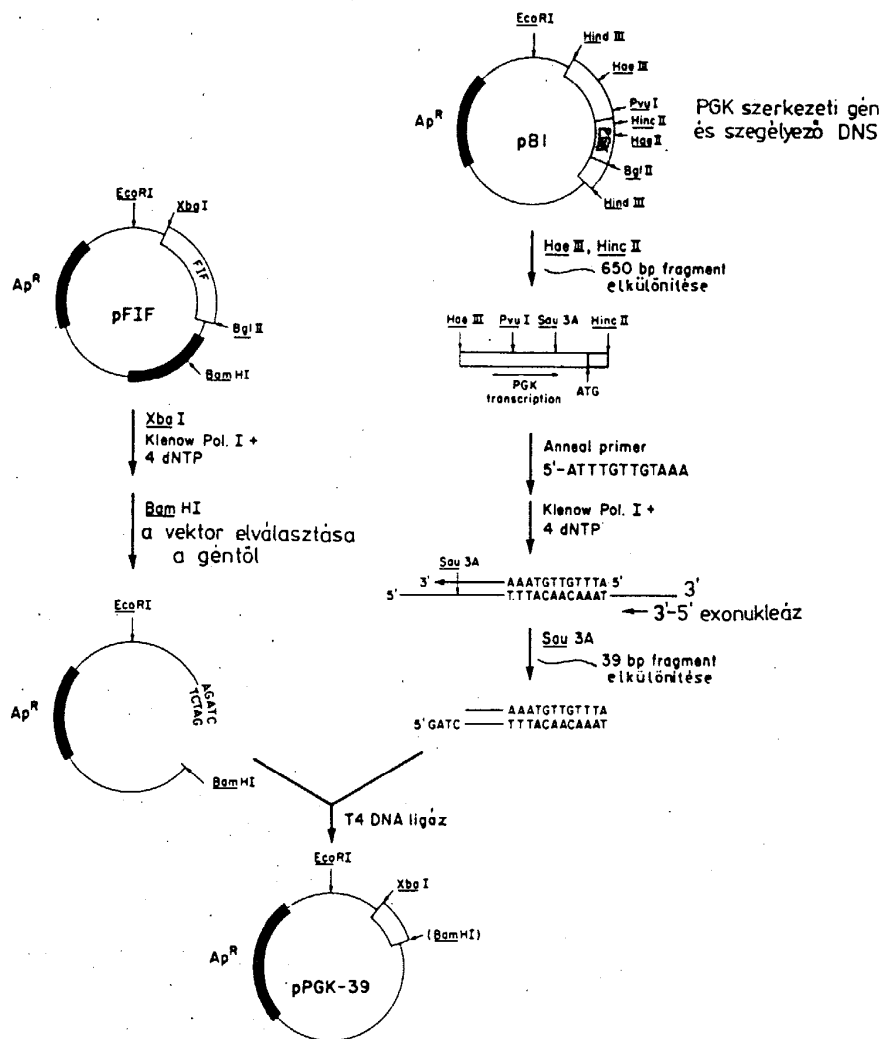


11. ábra

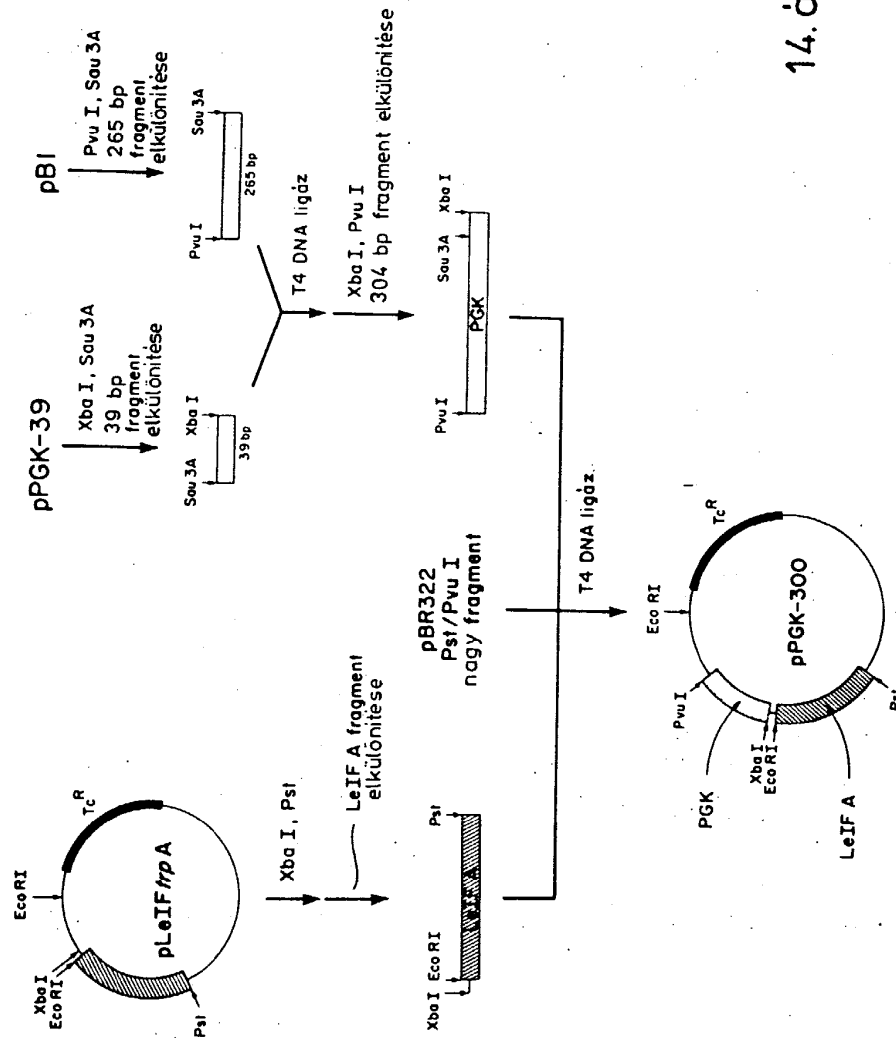
AZ ÉLESZTŐ 3-FOSZFOGLICERÁT-KINÁZ SZERKEZETI GÉNJE
5'-VÉGÉNEK DNS-SZEKVENCIAJA ÉS A SZEGÉLYEZŐ DNS

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

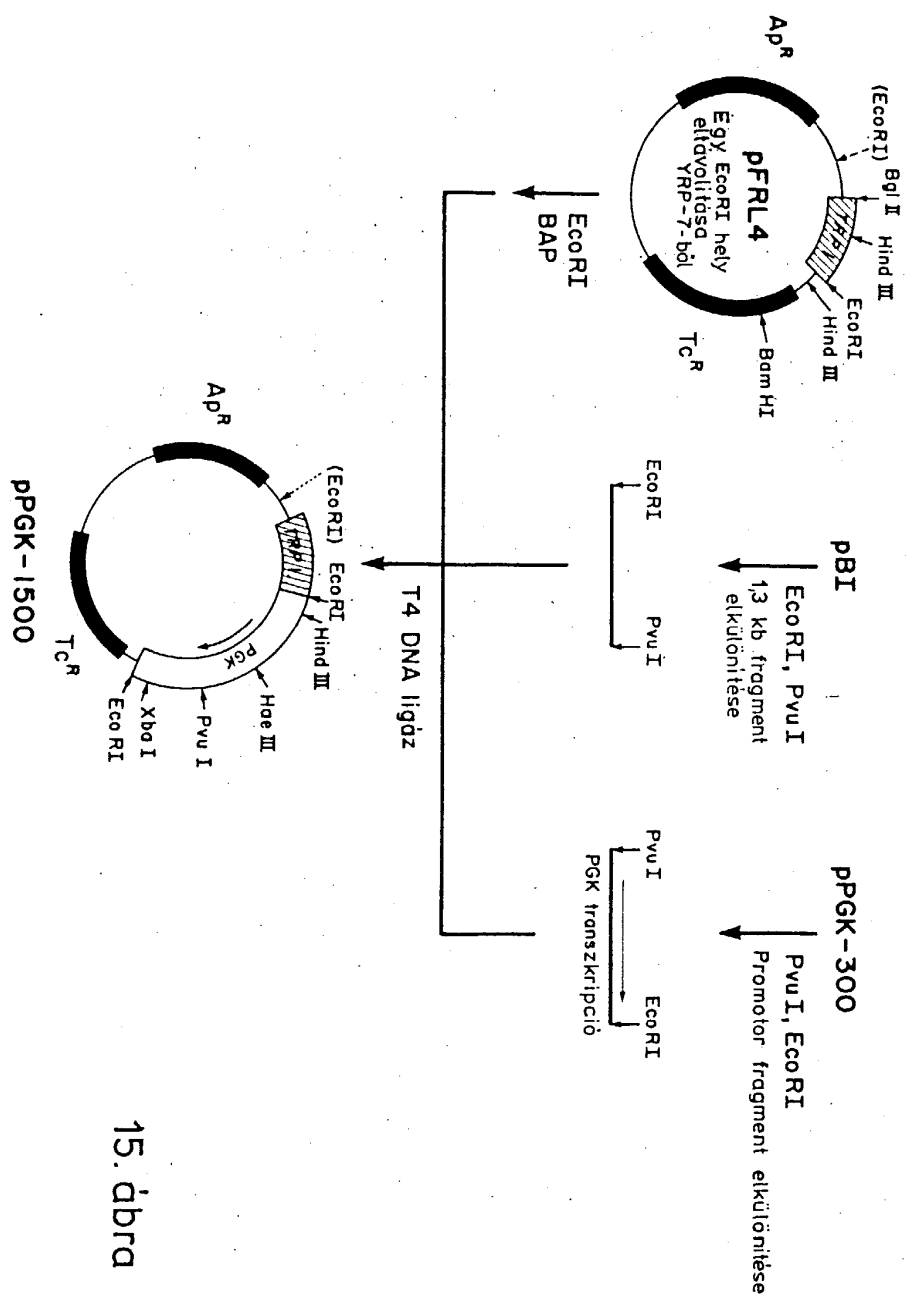
12. ábra

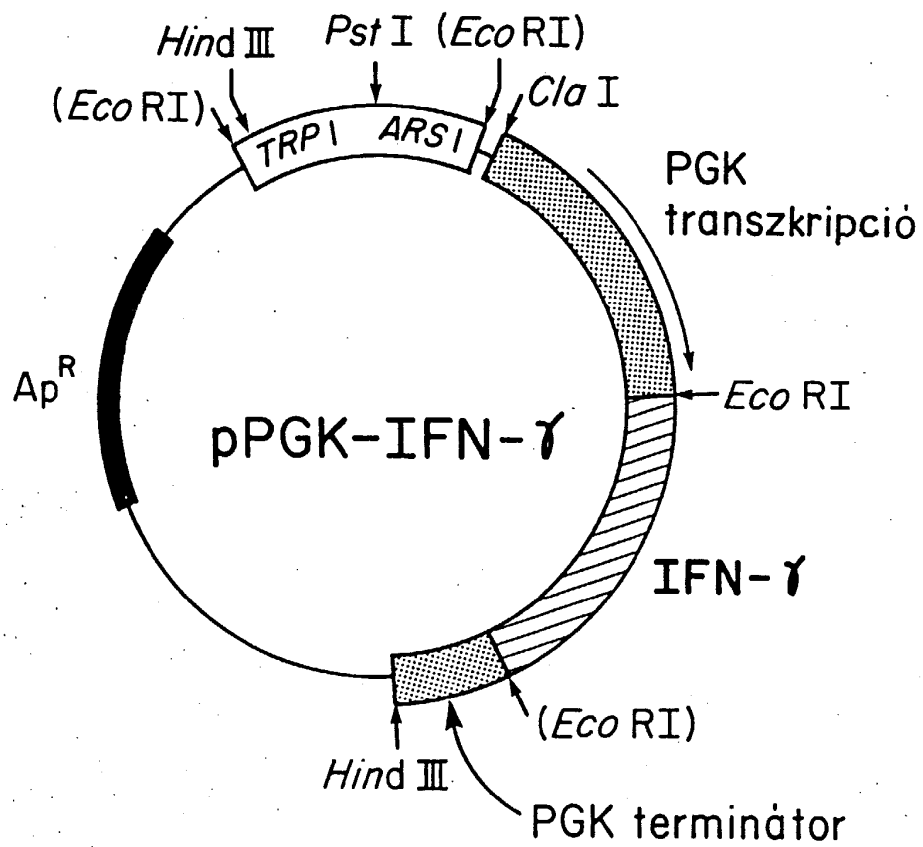


13.ábra



14. ábra





16. ábra