

(19) DANMARK



Patentdirektoratet
TAASTRUP

(12) PATENTSKRIFT

(11) 169347 B1

(21) Patentansøgning nr.: 1472/92	(51) Int.Cl.5	C 07 K 13/00 C 07 K 15/26
(22) Indleveringsdag: 08 dec 1992		
(24) Løbedag: 19 dec 1984		
(41) Alm. tilgængelig: 08 dec 1992		
(45) Patentets meddelelse bkg. den: 10 okt 1994		
(86) International ansøgning nr.: -		
(62) Stamansøgning nr.: 6108/84		
(30) Prioritet: 26 dec 1983 JP 246456/83 25 jul 1984 JP 154713/84		

(73) Patenthaver: *Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.; 6-1, Ohtemachi Itchome, Chiyoda-ku; Tokyo, JP
(72) Opfinder: Seiga *Itoh; JP, Susumu *Sekine; JP, Akiko *Saito; JP, Moriyuki *Sato; JP

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

(54) Derivat af humant interferon-gamma-polypeptid

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

1472-92

Et derivat af humant interferon- γ -polypeptid, der indkodes af et rekombinant plasmid.

Ansøgningen angår derivater af humant interferon- γ -polypeptid.

Interferoner (i det følgende benævnt IFN) kan så vidt vides klassificeres i tre store grupper, nemlig IFN- α , IFN- β og IFN- γ . IFN- α fremstilles hovedsageligt ud fra leukocytter, IFN- β ud fra fibroblaster og IFN- γ ud fra T-lymphocytter. Disse interferoner er blevet noteret som biologisk aktive stoffer med antiviral aktivitet, aktive-
10 rende egenskaber på naturlige killer-celler og makrofager, antitumor aktivitet og lignende. Overføringsmetoderne til opnåelse af interferoner ved isolering fra leukocytter og dyrkede celler kan imidlertid ikke give dem i tilstrækkelig mængde.

Rekombinant DNA-teknologi er nu blevet udviklet i en sådan grad, at masseproduktion af stoffer, som kun udskilles i en lille mængde i celler fra højere dyr og er vanskelige at isolere, såsom IFN, er blevet mulig ved anvendelse af mikroorganismer. F.eks. blev mRNA'er fra IFN- β og IFN- α isoleret fra celler, og DNA komplementær til mRNA (cDNA) blev syntetiseret enzymatisk og klonet i Escherichia coli [Taniguchi, et al.: Proc. Jap. Acad., 55 (B) 464-469 (1979, Nagata, et al.: Nature 284, 316-320 (1980))].
25

Hvad angår IFN- γ er det rapporteret, at det har en stærkere celleinhiberende aktivitet end andre IFN'er, baseret på det eksperiment, der gør brug af animalske celler [B.Y. Rubin og S.L. Gupta: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77, 5928-5932 (1980)]. Endvidere er kloning af en IFN- γ cDNA i Escherichia coli og bestemmelse af dens base-
30 sekvens nyligt rapporteret [P.W. Gray, et al.: Nature 295, 503 (1982), R. Devos, et al.: Nucleic Acids Research 10, 2487 (1982)].
35

Opfinderne af den foreliggende opfindelse har uafhængigt klonet en DNA kodende for IFN- γ til opnåelse af en klon kodende for et hidtil ukendt IFN- γ , hvori, hvilket fremgår af den i tabel 1 viste basesekvens, den niende aminosyre for det modne IFN- γ , der er rapporteret af Devos et al., lysin (Lys), (AAA), er erstattet med glutamin (Gln) (CAA). Endvidere blev IFN- γ genet inkorporeret i vektor pKYP-10 med tryptophanpromotor (japansk offentliggjort uundersøgt patentansøgning nr. 110600/83), og masseproduktion af IFN- γ i Escherichia coli er opnået.

Derefter har opfinderne af den foreliggende opfindelse studeret produktionen af derivater af IFN- γ polypeptid under anvendelse af det i tabel 1 viste IFN- γ gen som udgangsmateriale.

Det blev rapporteret, at deletion af 11 aminosyrer fra den C-terminale ende af IFN- α nedsatte den specifikke aktivitet til en tredjedel [A.E. Franke, et al.: DNA 1, 223-230 (1981)], hvorimod addition af 18 aminosyrer til den N-terminale ende af IFN- α ikke ændrer den specifikke aktivitet [R.M. King et al.: J. Gen. Virol. 64, 1815-1818 (1983)].

Derivater af IFN- γ er endnu ikke rapporteret. Opfinderne af den foreliggende opfindelse har konstrueret et derivat, hvori den tredje aminosyre i IFN- γ som vist i tabel 1, cystein (Cys), blev erstattet med tyrosin (Tyr) (i det følgende benævnt 3-Tyr-IFN- γ) og fandt, at den specifikke aktivitet var 2-4 gange stærkere end for moderstoffet IFN- γ . Endvidere konstrueredes de derivater, hvori Cys i stilling 1 var erstattet med serin (Ser) (1-Ser-IFN- γ), Cys i stilling 3 var erstattet med Ser (3-Ser-IFN- γ), Cys i stilling 1 og 3 var erstattet med Ser (1,3-Ser-IFN- γ), og N-terminale aminosyrer af IFN- γ vist i tabel 1 var slettet. Der blev for alle derivaterne, sammenlignet med udgangsmaterialet IFN- γ , detekteret tilsvarende eller

større interferonaktivitet.

Den foreliggende opfindelse angår som nævnt et hidtil ukendt derivat af humant interferon- γ -polypeptid med for-

5 øget aktivitet i forhold til kendte IFN- γ -forbindelser.

TABEL 1

CACATTGTTCTGATCATCTGAAGATCAGCTATTAGAAGAGAAAGATCAGTTAAGTCCTTTGGACCTGATCAGCTTGATACAAGAACTACTGATT

-20
met

CAACTTCTTTGGCTTAATTCTCTCGAAACG ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TTT CAG CTC TGC ATC GTT TTG

10
↑

gly ser-leu gly CYS TYR CYS GLN ASP PRO TYR VAL GLN GLU ALA GLU ASN LEU LYS LYS TYR PHE ASN ALA
GGT TCT CTT GGC TGT TAC TGC CAG GAC CCA TAT GTA CAA GAA GCA GAA AAC CTT AAG AAA TAT TTT AAT GCA

30
↑

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

60
↑

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

80
↑

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

100
↑

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

120
↑

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

140
↑

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

TATGGGGAATATATTTTTAGACTCATCAATCAAATAAGTATTTATAATAGCAACTTTTGTGTAATGAAAATGAATATCTATTAATATATGTATTA

TTTATAATTCCTATATCCTGTGACTGTCTCACTTAATCCTTTGTTTCTGACTAATTAGGCAAGGCTATGTGATTACAAGGCTTTATCTCAGGGG

CCAACTAGGCAGCCAACCTAAGCAAGATCCCATGGGTTGTGTGTTATTTCACTTGATGATACAATGAACACTTATAAGTGAAGTGATACTATCC

AGTTACTA CCCCCC
↑

På tegningen viser

- fig. 1 flow sheetet til konstruktion af pGBD-1,
- 5 fig. 2 flow sheetet til konstruktion af pGSB-6 og pGVA-4,
- fig. 3 flow sheetet til konstruktion af pGKV-13,
- fig. 4 flow sheetet til konstruktion af pGWC-10,
- 10 fig. 5 flow sheetet til konstruktion af pGVL-10,
- fig. 6 flow sheetet til konstruktion af pGVM101 og
- 15 fig. 7 flow sheetet til konstruktion af pGWE4.

Den foreliggende opfindelse omhandler et rekombinant plasmid, hvori en DNA, der koder for et hidtil ukendt derivat af humant IFN- γ , er inkorporeret, en mikroorganisme indeholdende plasmidet, en fremgangsmåde til fremstilling af et hidtil ukendt derivat af humant IFN- γ -polypeptid under anvendelse af mikroorganismen og derivatet af det humane IFN- γ -polypeptid som sådant.

20

25 Konstruktion af det rekombinante plasmid udføres under anvendelse af cDNA opnået fra messenger-RNA kodende for IFN- γ ved rekombinant DNA-teknologi eller chromosomal DNA kodende for IFN- γ som udgangsmateriale.

30 I den foreliggende opfindelse kan en vilkårlig human IFN- γ -cDNA anvendes, og foretrukket anvendes pIFN γ -G4. Escherichia coli indeholdende pIFN γ -G4 er blevet deponeret i American Type Culture Collection, USA under nummeret ATCC 39123.

35 Basesequensen for IFN- γ -DNA i pIFN γ -G5 blev bestemt ved metoden af Maxam og Gilbert [Proc. Natl. Acad. Sci. 74,

560 (1977)] og er vist i tabel 1.

Sammenligning af den humane IFN- γ -cDNA i pIFN γ -G4 og den kendte IFN- γ -cDNA [R. Devos, et al.: Nucleic Acids Research, 10, 2487 (1982)] afslører følgende: Den første base [adenin (A)] af den triplet, der koder for lysin (den niende aminosyre i det modne humane IFN- γ -polypeptid) i det kendte IFN- γ , erstattes med cytosin (C) i pIFN γ -G4 cDNA'en. Følgelig er den niende aminosyre fra den N-terminale ende af det humane IFN- γ -polypeptid indkodet med pIFN γ -G4-cDNA glutamin og ikke lysin. Det er derfor indlysende, at pIFN γ -G4 koder for et hidtil ukendt humant IFN- γ -polypeptid.

Derivater af IFN- γ opnået ved deletion eller erstatning af aminosyrer i IFN- γ vist i tabel 1 er også hidtil ukendte IFN- γ -derivater.

Som plasmid til inkorporering af en DNA kodende for IFN- γ -derivat kan anvendes et vilkårligt plasmid, så længe DNA inkorporeret deri kan udtrykkes i Escherichia coli. Fortrinsvis anvendes et plasmid, hvori en fremmed DNA kan indsættes efter en egnet promotor, såsom trp-promotor eller lac-promotor, og længden mellem Shine-Dalgarno-sekvens (i det følgende benævnt SD-sekvens) og initieringscodon (ATG) indstilles, f.eks. til 6-18 basepar. Foretrukne eksempler er pKYP10, pKYP11 og pKYP12, der blev konstrueret af opfinderne af den foreliggende opfindelse (japansk offentliggjort uundersøgt patentansøgning nr. 110600/83).

Som vist på tegningens fig. 1 spaltes pIFN γ -G4 med PvuII, og BamHI-linker indføres i spaltningsstedet til opnåelse af pGBD-1.

Derpå nedbrydes pGBD-1 med SinI og BamHI, og et fragment på ca. 850 bp renses ved lav-geleringstemperatur-agarose-

gelelektroforese (LGT-metoden) [L. Wieslander: Analytical Biochemistry 98, 305 (1979)]. pKYP10 nedbrydes med ClaI og BamHI, og et fragment på ca. 4,3 kb renses. De således opnåede DNA-fragmenter og en syntetisk DNA vist på fig. 2, som koder for Tyr som den tredje aminosyre, ligeres med T4-DNA-ligase til opnåelse af pGSB-6. Derpå nedbrydes pGSB-6 med ClaI og underkastes ifyldningsreaktion med DNA-polymerase I og ligeringsreaktion med T4-DNA-ligase til opnåelse af pGVA-4. Den samme procedure gentages med undtagelse af, at man anvender den syntetiske DNA, der er vist på fig. 3, og som koder for Ser, som den første og tredje aminosyre til opnåelse af plasmid pGVK-13, som koder for et derivat, hvori første og tredje aminosyre fra den N-terminale ende i IFN- γ , Cys, er erstattet med Ser.

For at opnå et IFN- γ -derivat, hvori N-terminale aminosyrer er deleterede, som vist på fig. 4, nedbrydes pGKA-2 med ClaI, nedbrydes med Bal31 i et kort tidsrum på 1-30 minutter for at udskære den DNA, der koder for N-terminal aminosyre i IFN- γ , og behandles med PstI, og et fragment på 4,3 kb renses. Separat nedbrydes vektor pTrS-3 indeholdende initieringscodon med SphI, behandles med DNA-polymerase I og nedbrydes med PstI, og et fragment på 880 bp renses. Begge fragmenter ligeres med T4-ligase til opnåelse af pGWC-10.

Reaktionsbetingelser påkrævet til den rekombinante DNA-teknologi beskrevet i det foregående er generelt som følger.

Nedbrydning af DNA med restriktionsenzymer udføres sædvanligvis ved at omsætte 0,1-20 μ g DNA med 0,1-100 enheder, foretrukket 1-3 enheder restriktionsenzym pr. μ g DNA i en blanding af 2-200 mM, foretrukket 10-30 mM Tris-HCl (pH 6,0-9,5, foretrukket pH 7,0-8,0), 0-200 mM NaCl og 2-20 mM, foretrukket 5-10 mM $MgCl_2$ ved 20-70 °C (optimal temperatur afhænger af anvendte restriktionsen-

zymer) i 15 minutter til 24 timer. Reaktionen standses sædvanligvis ved opvarmning til 55-75 °C i 5-30 minutter eller også ved at inaktivere restriktionsenzymet med reagenset, såsom phenol eller diethylpyrocarbonat.

5

Rensning af DNA-fragmenterne dannet ved nedbrydningen med restriktionsenzymer udføres ved LGT-metoden eller polyacrylamidgelelektroforese [A.M. Maxam et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74, 560 (1977)].

10

Ligering af DNA-fragmenterne udføres med 0,3-10 enheder T4-DNA-ligase i en blanding af 2-200 mM, foretrukket 10-40 mM Tris-HCl (pH 6,1-9,5, foretrukket 7,0-8,0), 2-20 mM, foretrukket 5-10 mM MgCl₂, 0,1-10 mM, foretrukket 0,5-2,0 mM ATP og 1-50 mM, foretrukket 5-10 mM dithiothreitol ved 1-37 °C, foretrukket 3-20 °C i 15 minutter til 72 timer, foretrukket 2-20 timer. Den rekombinante plasmide DNA, der dannes ved ligeringsreaktionen, indføres i Escherichia coli ved transformationsmetoden ifølge Cohen et al. [S.N. Cohen et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 (1972)], om nødvendigt. Isolering af den rekombinante plasmide DNA fra Escherichia coli, der bærer DNA'en, udføres ved den metode, der er beskrevet i eksempel 1, eller ved metoden af Birnboim et al. [H. C. Birnboim et al.: Nucleic Acids Res. 7, 1513 (1979)]. Plasmid DNA nedbrydes med 1-10 typer restriktionsendonucleaser, og kløvningsstederne undersøges ved agarosegelelektroforese eller polyacrylamidgelelektroforese. Endvidere undersøges, om nødvendigt, basesekvensen for DNA ved metoden af Maxam-Gilbert [Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 560 (1977)].

15

20

25

30

Derivatet af IFN- γ -polypeptidet ifølge opfindelsen fremstilles ved følgende metode.

35

Escherichia coli K-12 HB101 transformeres med et plasmid, såsom pGVA-4, og en Escherichia coli stamme bærende pGVA-

4 udvælges fra de ampicillinresistente kolonier (i det følgende benævnt Ap^R). Den *Escherichia coli* stamme, der bærer pGVA-4, dyrkes i et medium til fremstilling af et derivat af IFN- γ -polypeptid i de dyrkede celler.

5

Som mediet kan anvendes enten et syntetisk medium eller et naturligt medium, så længe det er egnet til dyrkningen af *Escherichia coli* og produktionen af derivatet af IFN- γ -polypeptid.

10

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

15

Som nitrogenkilde kan anvendes NH_4Cl , $(NH_4)_2SO_4$, casaminosyre, gærekstrakt, polypepton, kødekstrakt, Bactotrypton, majsstøbevæske, etc.

20

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

25

Dyrkning foretages ved pH 5,5-8,5 og ved 18-40 °C med luftning og omrøring.

Efter dyrkning i 5-90 timer akkumuleres derivatet af humant IFN- γ -polypeptid i dyrkede celler. De opsamlede celler behandles med lysozym, sønderdeles ved gentagen frysning og optøning og underkastes centrifugering. Den således opnåede ovenliggende væske underkastes ekstraktion efter en konventionel metode til ekstraktion af polypeptider til udvinding af polypeptidet.

30

Bestemmelse af humant IFN- γ udføres efter metoden af Armstrong [J.A. Armstrong et al.: Appl. Microbiol. 21, 723-725 (1971)].

35

Opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

EKSEMPEL 1

Konstruktion af plasmid pGWC-10 kodende for det polypeptid, hvori et N-terminalt område af humant IFN- γ er deletet:

25 μ g pGKA-2 (5,2 kb) opnået ved fremgangsmåden ifølge referenceeksempel 2 blev opløst i 400 μ liter af en pufferopløsning bestående af 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 10 mM NaCl (i det følgende benævnt "Y-10 pufferopløsning"). 50 enheder ClaI (produkt fra Boehringer Mannheim GmbH) blev tilsat og nedbrydningsreaktion udført ved 37 °C i 3 timer. Til 80 μ liter af reaktionsopløsningen indeholdende 5 μ g DNA blev der sat 12 μ liter 10-fold koncentreret BAL31 pufferopløsning [200 mM Tris-HCl (pH 8,1), 1 M NaCl, 120 mM CaCl₂], 28 μ liter vand og 0,25 enhed nuclease-BAL31 [produkt fra Bethesda Research Laboratories (BRL)], reaktion blev udført ved 30 °C i 20 sekunder. BAL31 har den aktivitet for exonuclease, som nedbryder et DNA-molekyle fra enden, og ca. 30 basepar DNA fra ClaI-stedet blev nedbrudt under de ovennævnte betingelser. DNA blev udvundet fra reaktionsopløsningen ved phenolekstraktion, chloroformekstraktion og ethanoludfældning. 1,0 μ g af det således udvundne pGKA-2-fragment nedbrudt med ClaI og BAL31 blev opløst i 20 μ liter Y-50 pufferopløsning. 2 enheder PstI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 2 timer. Fra reaktionsopløsningen blev der udvundet 0,5 μ g DNA-fragment på ca. 4,3 kb ved LGT-metoden.

Derpå blev 5,0 μ g ATG-udtrykkelsesvektor pTrS3 (3,8 kb) opløst i 40 μ liter Y-50 pufferopløsning. 10 enheder SphI (produkt fra BRL) blev tilsat og nedbrydningsreaktion udført ved 37 °C i 3 timer. Efter phenolekstraktion og chloroformekstraktion udvandedes ca. 3,0 μ g DNA-fragment ved ethanoludfældning. Ca. 3,0 μ g af DNA-fragmentet blev opløst i en opløsning bestående af 67 mM Tris-HCl (pH

- 8,3), 6,7 mM MgCl_2 , 10 mM mercaptoethanol, 6,7 μM EDTA og 16,6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, og 1 mM af hvert af stofferne dATP, dTTP, dCTP og dGRP blev tilsat. Endvidere blev der tilsat 6 enheder T4-DNA-polymerase (produkt fra Takara Shuzo Co., hvilket også gælder det følgende), og reaktionen blev udført ved 37 °C i 1 time til nedbrydning af den fremstikkende ende. Efter phenolekstraktion blev der ved ethanoludfældning udvundet 1,0 μg DNA-fragment. 1,0 μg af DNA-fragmentet blev opløst i 20 μl iter (totalvolumen) Y-50 pufferopløsning. 2 enheder PstI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Fra reaktionsopløsningen blev der udvundet 0,5 μg DNA-fragment på ca. 880 bp indeholdende P_{trp} ved LGT-metoden.
- 0,5 μg ClaI-PstI-fragment (ca. 4,3 kb) af pGKA2 opnået i det foregående og 0,5 μg pTrs3-SphI-T4-polymerase-PstI-fragment (880 bp) opnået som i det foregående blev opløst i 10 μl iter (totalvolumen) T4-ligase-pufferopløsning. 0,3 enhed T4-DNA-ligase blev tilsat og ligeringsreaktion udført ved 4 °C i 18 timer.

- Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den således opnåede rekombinante plasmide blanding, og plasmid DNA blev udvundet fra Ap^R -kolonien, der var dannet, til opnåelse af pGWC-10 som vist på fig. 5. Strukturen af pGWC-10 blev fundet ved nedbrydning med EcoRI, ClaI og BamHI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved fremgangsmåden af Maxam og Gilbert, at sekvensen ved den N-terminale ende af det humane IFN- γ -strukturen i pGWC-10 var som følger.

Met Val Gln Glu Ala Glu
-ATG GTA CAA GAA GCA GAA

- Det blev også bekræftet, at 7 aminosyrer fra den N-terminale aminosyre (Cys) til den syvende aminosyre (Tyr) af det modne humane IFN- γ -polypeptid var deleteret, og at

det humane IFN- γ -polypeptidderivat startede med den ot-
tende aminosyre (Val) [derivatet kaldes IFN- γ (Δ 1-7)].
Escherichia coli stamme bærende plasmid pGWC-10 er blevet
deponeret hos FERM som Escherichia coli IGWC-10 (FERM BP-
397).

EKSEMPEL 2

Fremstilling af IFN- γ -derivater med Escherichia coli
stammer bærende pGBD-1, pGVA-4, pGVK-13 og pGWC-10:

Escherichia coli HB101 stammer bærende rekombinante plas-
mider pGBD-1, pGVA-4, pGVK-13, opnået i eksempel 1-3 i DK
patentansøgning nr. 6108/84, og pGWC-10 opnået i eksempel
1, som kaldes IGBD-1, IGVA-4, IGVK-13 og IGWC-10, blev
dyrket ved 37 °C i 18 timer i LG-medium (10 g trypton, 5
g gærekstrakt, 5 g NaCl, 2 g glucose, 1 liter vand, ind-
stillet til pH 7,0 med NaOH). 0,2 ml af dyrkningsvæsken
blev podet over i 10 ml MCG-medium (0,6% Na₂HPO₄, 0,3%
KH₂PO₄, 0,5% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 0,5% glucose, 0,5% casami-
nosyre, 1 mM MgSO₄, 4 µg/ml vitamin B₁, pH 7,2), og dyrk-
ning blev udført ved 30 °C i 4 timer. Derpå blev 10 µg/ml
indolacrylsyre (i det følgende benævnt IAA), som er en
inducer for tryptophan-operon, tilsat, og dyrkning blev
fortsat i 4 timer. Dyrkningsvæsken blev centrifugeret ved
8000 omdr./min. i 10 minutter, og de høstede celler blev
vasket med en pufferopløsning indeholdende 30 mM NaCl og
30 mM Tris-HCl (pH 7,5). Vaskede celler blev suspenderet
i 1 ml af den i det følgende beskrevne pufferopløsning,
og 5 µliter af en opløsning indeholdende 200 µg lysozym
og 0,25 M EDTA (ethylendiamintetraeddikesyre) blev til-
sat. Blandingen fik lov at henstå ved 0 °C i 30 minutter
og frysning og tøning blev gentaget 3 gange for at bryde
cellerne. De brudte celler blev centrifugeret ved 15000
omdr./min. i 30 minutter til opnåelse af en overliggende
væske. Mængden af interferon i den overliggende væske
blev bestemt efter metoden af Armstrong [J.A. Armstrong

et al.: Appl. Microbiol. 21, 723-725 (1971)], hvori Sind-vis-virus blev anvendt som virus, og FL-celler afledt fra humane amnionceller blev anvendt som dyrecellerne. Resultaterne fremgår af tabel 2.

5

TABEL 2

10	Produkt, som			IFN- γ (enh./ml)
	Stammer	Plasmid	plasmidet koder for	
	IGBD-1	pGBD-1	IFN- γ	spor
	IGVA-4	pGVA-4	3-Tyr-IFN- γ	9×10^4
15	IGVK-13	pGVK-13	1,3-Ser-IFN- γ	2×10^5
	IGWC-10	pGWC-10	IFN- γ (Δ 1-7)	5×10^4
	IGKA-2	pGKA-2	IFN- γ	2×10^4

20 IGKA-2 er en stamme, der bærer plasmid pGKA-2, der koder for IFN- γ .

EKSEMPEL 3

25 Konstruktion af plasmid pGWE4, der koder for det polypeptid, hvori et N-terminalt område af det humane IFN- γ er deleteret:

25 μ g pGKA2 (5,2 kb) opnået ved fremgangsmåden ifølge referenceeksempel 2 blev opløst i 400 μ liter Y-10 pufferopløsning. 50 enheder ClaI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion udført ved 37 °C i 3 timer. Til 80 μ liter af reaktionsopløsningen indeholdende 5 μ g DNA blev der sat 12 μ liter 10-fold koncentreret BAL31 pufferopløsning, 28 μ liter vand og 0,25 enhed nuclease BAL31, og reaktionen blev udført ved 30 °C i 10 sekunder. BAL31 har aktiviteten for exonuclease, som nedbryder fra enden af et DNA-

molekyle, og ca. 20 basepar DNA fra ClaI-stedet blev nedbrudt under de i det foregående beskrevne betingelser. DNA blev genvundet fra reaktionsopløsningen ved phenolekstraktion, chloroformekstraktion og ethanoludfældning.

5 1,0 µg af det således udvundne pGKA2-fragment nedbrudt med ClaI og BAL31 blev opløst i 20 µliter Y-50 pufferopløsning. 2 enheder PstI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 2 timer. Fra reaktionsopløsningen blev der udvundet 0,5 µg DNA-fragment på ca. 4,3
10 kb ved LGT-metoden.

Derpå blev 5,0 µg ATG-udtrykkelsesvektor pTrS3 (3,8 kb) opløst i 40 µliter Y-50 pufferopløsning. 10 enheder SphI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37
15 °C i 3 timer. Efter phenolekstraktion og chloroformekstraktion blev ca. 3,0 µg DNA-fragment udvundet ved ethanoludfældning. Ca. 3,0 µg af DNA-fragmentet blev opløst i en opløsning bestående af 67 mM Tris-HCl (pH 8,3), 6,7 mM MgCl₂, 10 mM mercaptoethanol, 6,7 µM EDTA og 16,6 mM
20 (NH₄)₂SO₄ og 1 mM af hvert af stofferne dATP, dTTP, dCTP og dGTP. Endvidere blev der tilsat 6 enheder T4-DNA-polymerase, og reaktionen blev udført ved 37 °C i 1 time til nedbrydning af den fremstikkende ende. Efter phenolekstraktion og chloroformekstraktion blev der udvundet 1,0
25 µg DNA-fragment ved ethanoludfældning. 1,0 µg af DNA-fragmentet blev opløst i 20 µliter (totalvolumen) Y-50 pufferopløsning. 2 enheder PstI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Fra reaktionsopløsningen blev der ved LGT-metoden udvundet 0,5 µg
30 DNA-fragment på ca. 880 bp indeholdende P_{trp}.

0,5 µg ClaI-PstI-fragment (ca. 4,3 kb) af pGKA2 opnået som i det foregående og 0,5 µg pTrS3-SphI-T4-polymerase-PstI-fragment (880 bp) opnået som i det foregående blev
35 opløst i 10 µliter (totalvolumen) T4-ligase-pufferopløsning. 0,3 enhed T4-DNA-ligase blev tilsat, og ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 18 timer.

Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den således opnåede rekombinante plasmide blanding, og plasmid-DNA blev udvundet fra Ap^R-kolonien, der var dannet, til opnåelse af pGWE4 som vist på fig. 7. Strukturen af pGWE4 blev fundet ved nedbrydning med EcoRI, ClaI og BamHI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved metoden af Maxam og Gilbert, at sekvensen ved den N-terminale ende af det humane IFN- γ -strukturen i pGWE4 var som følger.

10

Met Asp Pro Tyr Val Gln
-ATG GAC CCA TAT GTA CAA

Det blev også bekræftet, at 4 aminosyrer fra den N-terminale aminosyre (Cys) til den fjerde aminosyre (Gln) i det modne IFN- γ -polypeptid var udslettet, og at det humane IFN- γ -polypeptidderivat blev startet med den femte aminosyre (Asp) [derivatet kaldes IFN- γ (Δ -4)]. Escherichia coli stamme bærende plasmid pGWE4 er blevet deponeret hos FERM Escherichia coli IGWE4 (FERM BP-546).

20

EKSEMPEL 4

Produktion af IFN- γ -derivater med Escherichia coli stammer bærende pGVL10, pGVM101 og pGWE4:

25

Escherichia coli HB101 stammer bærende rekombinante plasmider pGVL10 opnået i eksempel 3 og pGVM101 og pGWE4 opnået i eksempel 5-6 i DK patentansøgning nr. 6108/84, som kaldes IGVL10, IGVM101 og IGWE4, blev dyrket ved 37 °C i 18 timer i LG-medium. 0,2 ml af dyrkningsmediet blev podet i 10 ml MCG-medium, og dyrkning blev foretaget ved 30 °C i 4 timer. Derpå blev der tilsat 10 μ g/ml IAA, og dyrkning blev fortsat i 4 timer. Dyrkningsmediet blev centrifugeret ved 8000 omdr./min. i 10 minutter, og de høstede celler blev vasket med en pufferopløsning indeholdende 30 mM NaCl og 30 mM Tris-HCl (pH 7,5). Vaskede

30

35

celler blev suspenderet i 1 ml pufferopløsning som beskrevet i det foregående, og 5 μ liter af en opløsning indeholdende 200 μ g lysozym og 0,25 M EDTA blev tilsat. Blandingen blev centrifugeret i 30 minutter til opnåelse af en overliggende væske. Mængden af interferon i den overliggende væske blev bestemt efter metoden af Armstrong, hvori Sindvis-virus blev anvendt som virus, og FL-celler afledt fra humane amnionceller blev anvendt som dyrecellerne. Resultaterne er vist i tabel 3.

TABEL 3

Stammer	Plasmid	Produkt, som plasmidet koder for	
		IFN- γ (enh./ml)	
IGBD1	pGBD1	IFN- γ	spor
IGVL10	pGVL10	1-Ser-IFN- γ	8×10^4
IGVM101	pGVM101	3-Ser-IFN- γ	3×10^5
IGWE4	pGWE4	IFN- γ (Δ 1-4)	2×10^5
IGKA2	pGKA2	IFN- γ	2×10^4

IGKA-2 er en stamme, der bærer plasmid pGKA2, der koder for IFN- γ .

Referenceeksempel 1

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

I dette eksempel blev 6 μ g plasmid pIFN γ -G4 (3,6 kb) opløst i 50 μ liter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 50 mM NaCl. Derpå blev 12 enheder af hvert af restriktionsenzymene PvuII og HindIII tilsat, og ned-

brydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 4 timer. Reaktionsopløsningen blev opvarmet ved 65 °C i 7 minutter til inaktivering af enzymerne og underkastet rensning ved LGT-metoden til opnåelse af 1,2 µg af et DNA-fragment på 1,3 kb indeholdende human IFN- γ -DNA.

Separat blev 4 µg pKYP-11 opløst i 40 µliter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 50 mM NaCl. 8 enheder BamHI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Reaktionsopløsningen blev opvarmet ved 65 °C i 5 minutter til inaktivering af enzymet. Derefter blev 30 µM af hvert af stofferne dATP, dCTP, dGTP og dTTP tilsat, og 8 enheder Escherichia coli DNA-polymerase I (Klenow-fragment, produkt fra New England Biolabs, 1 µliter) blev tilsat. Ifyldningsreaktion blev udført ved 15 °C i 1 time, og reaktionsopløsningen blev opvarmet ved 68 °C i 15 minutter til inaktivering af DNA-polymerase I. 10 enheder HindIII blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer efterfulgt af opvarmning ved 65 °C i 5 minutter til at inaktivere HindIII. Nedbrydningsreaktionsopløsningen af plasmidet pKYP-11 blev underkastet rensning ved LGT-metoden til opnåelse af ca. 2,5 µg af et DNA-fragment på ca. 4,7 kb indeholdende P_{trp}.

Derpå blev 0,5 µg af DNA-fragmentet på 1,3 kb indeholdende human IFN- γ -DNA og 1,0 µg af DNA-fragmentet på ca. 4,7 kb indeholdende P_{trp}, som blev opnået fra plasmidet pKYP-11, opløst i 20 µliter af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol og 500 µM ATP, og 4 enheder T4-DNA-ligase (produkt fra New England Biolabs) blev tilsat. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 18 timer, og Escherichia coli HB101 blev transformeret med den opnåede rekombinante plasmidblanding ved konventionel teknik til opnåelse af en Ap^R-koloni. Et plasmid, pGC-7, blev skilt fra dyrkningsmediet for

kolonien. Strukturen af pGC-7 blev bekræftet ved nedbrydningen med HindIII, BamHI, HpaI, SalI, EcoRI og ClaI og agarosegelelektroforese. Escherichia coli stamme indeholdende pGC-7 er blevet deponeret hos FERM som Escherichia coli IGC-7 (FERM P-6814, FERM BP-497).

Referenceeksempel 2

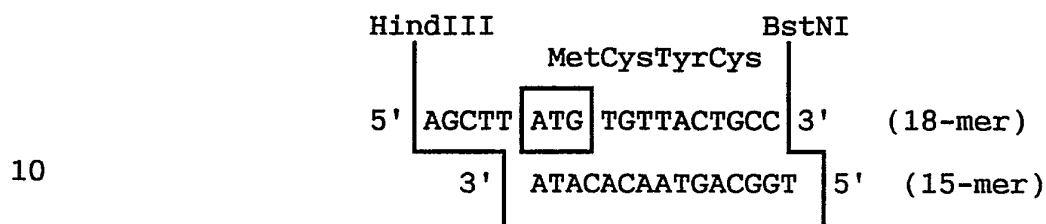
Konstruktion af rekombinant plasmid pGKA-2:

I dette eksempel blev 6 µg af den i referenceeksempel 1 opnåede PGC-7-DNA opløst i 59 µliter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 10 mM NaCl, og 12 enheder BstNI (produkt fra New England Biolabs) blev tilsat. Der blev udført reaktion ved 60 °C i 3 timer, og reaktionsopløsningen blev opvarmet ved 65 °C i 5 minutter til inaktivering af BstNI. Derpå blev 150 mM NaCl og 8 enheder SalI tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Reaktionsopløsningen blev genopvarmet ved 65 °C i 5 minutter til inaktivering af SalI og underkastet rensning ved LGT-metoden til opnåelse af 0,8 µg af et DNA-fragment på ca. 1125 bp indeholdende størstedelen af den humane IFN-γ-DNA.

Separat blev 3 µg pKYP-10 opløst i 40 µliter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 100 mM NaCl. 6 enheder af hvert af stofferne HindIII og SalI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Reaktionsopløsningen blev opvarmet ved 65 °C i 5 minutter for at inaktivere HindIII og SalI og underkastet rensning ved LGT-metoden til opnåelse af ca. 1,8 µg af et DNA-fragment på ca. 4,1 kb indeholdende P_{trp}.

Den N-terminale aminosyre i det modne humane IFN-γ-polypeptid er Cys. For at udtrykke moden IFN-γ-DNA er det

nødvendigt at tilvejebringe en initieringscodon (ATG) lige før den 5'-terminale codon TGT (Cys) og yderligere at indstille længden mellem SD-sekvens efter P_{trp} og ATG til en passende længde på 6-18 bp. Derfor syntetiseredes følgende DNA-linker.



15 To enkeltkædede DNA'er af 18-mer og 15-mer blev syntetiseret ved en konventionel triestermetode [R. Crea et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA 75, 5765 (1978)]. Derpå blev 2 μ g af den 18-mere og 2 μ g af den 15-mere DNA opløst i 20 μ liter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA og 1 mM ATP. 30 enheder T4-polynucleotid-kinase (produkt fra Boehringer Mannheim GmbH) blev tilsat, og phosphoryleringsreaktion blev udført ved 20 37 °C i 60 minutter.

25 Derpå blev 2 μ g af såvel phosphoryleret 18-mer som 15-mer DNA blandet, og blandingen blev opvarmet ved 70 °C i 5 minutter og fik lov at stå ved stuetemperatur til annealing til opnåelse af DNA-linkeren med den i det foregående givne struktur.

30 0,4 μ g af BstNI-SalI-fragmentet på 1125 bp opnået som i det foregående og afledt fra pGC-7 og 1,0 μ g af DNA-fragmentet på 4,1 kb opnået ved nedbrydning af udtrykkelsesvektoren pKYP-10 med HindIII og SalI blev opløst i 25 μ liter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM $MgCl_2$, 5 mM dithiothreitol og 500 35

- 5 μ M ATP. Ca. 0,1 μ g af DNA-linkeren nævnt i det foregående blev sat til blandingen efterfulgt af tilsætning af 6 enheder T4-DNA-ligase. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer. Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den opnåede rekombinante plasmide blanding ved konventionel teknik til opnåelse af en Ap^R-koloni. Et plasmid, pGKA-2, som vist på fig. 5, blev isoleret fra dyrkningsmediet for kolonien. Strukturen af pGKA-2 blev bekræftet ved nedbrydning med EcoRI, ClaI, 10 HindIII, BstNI og SalI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved metoden af Maxam-Gilbert, at basesequensen fra SD-sekvensen (AAGG) til initieringscodonen (ATG) i plasmidet pGKA-2 var "AAGGGTATCGATAAGCTTATG".
- 15 Escherichia coli stamme indeholdende pGKA-2 er blevet deponeret hos FERM som Escherichia coli IGKA-2 (FERM P-6798, FERM BP-496).

Aktivitetsforsøg

- 20 De efterfølgende forsøg viser, at interferon- γ -derivaterne ifølge opfindelsen adskiller sig væsentligt fra det kendte interferon- γ .

25 FORSØG 1

Aktivitet af interferon- γ i serum:

- 30 Aktiviteter af interferon- γ ifølge opfindelsen (herefter angivet som Gln⁹-IFN- γ) og den beskrevne i de modholdte publikationer (herefter angivet som Lys⁹-IFN- γ) i serum, blev undersøgt på følgende måde.

- 35 10 μ l af en opløsning indeholdende 100 μ g/ml IFN- γ (Gln⁹-IFN- γ eller Lys⁹-IFN- γ) og 490 μ l humant serum blev blandet, og blandingen blev holdt ved 37 °C i 24 timer. Blandingen blev fortyndet 50 gange med MEM medium indeholden-

de 5% kvægserumalbumin, og IFN- γ -aktiviteten (antivirus-aktivitet) blev bestemt ved metoden ifølge Armstrong (Armstrong J.A. et al.: Appl. Microbiol, 21, 723-725 (1971)). Som kontrol blev opløsningen indeholdende IFN- γ ,
 5 holdt ved 4 °C i 24 timer og blev underkastet undersøgelser. Resultaterne er vist i efterfølgende tabel.

		<u>Gln⁹-IFN-γ</u>			<u>Lys⁹-IFN-γ</u>		
		Antivirus-aktivitet (U/ml)	Gennemsnit	Aktivitetsforhold	Antivirus-aktivitet (U/ml)	Gennemsnit	Aktivitetsforhold
10							
15	Kontrol	200,0 158,0 149,9	169,3	1,00	193,3 201,8 241,2	212,1	1,00
20	Test	284,0 248,3 230,9	254,4	1,50	205,7 234,0 228,8	222,8	1,05

FORSØG 2

Aktivering af IFN- γ ved behandling med trypsin:

25 45 μ l hver af 50 μ g/ml Gln⁹-IFN- γ og 50 μ g/ml Lys⁹-IFN- γ blev respektivt sat til 5 μ liter af en trypsinopløsning under dannelse af blandinger indeholdende trypsin og
 30 IFN- γ i vægtforhold på 1:50, 1:100, 1:200 og 1:400. Blandingen blev inkuberet ved 5 °C i 60 minutter. 20 μ liter af blandingen blev tilsat til 980 μ l MEM medium indeholdende trypsininhibitor for at stoppe reaktionen. Antivirusaktivitet af reaktionsblandingen blev bestemt ved samme metode som beskrevet i forsøg 1. Resultaterne er vist

i den efterfølgende tabel.

5	Forhold af tryptase: IFN- γ	<u>Gln⁹-IFN-γ</u>		Akti- vitets- forhold	<u>Lys⁹-IFN-γ</u>		Akti- vitets- forhold
		Antivirus- aktivitet (U/ml)	Gennem- snit		Antivirus- aktivitet (U/ml)	Gennem- snit	
10	Kontrol	651,07 539,13 627,10	605,8	1,00	747,66 599,04 493,50	613,4	1,00
15	1:50	263,37 318,56 296,53	292,8	0,48	604,31 528,99 676,89	603,4	0,98
20	1:100	1059,30 843,73 760,21	887,7	1,46	633,76 684,30 748,04	688,7	1,12
25	1:200	1404,19 1388,89 1184,88	1326,0	2,18	1271,8 1214,5 1235,6	1240,6	2,02
30	1:400	1708,70 1448,74 1501,81	1553,1	2,56	1004,08 1566,84 1356,62	1309,2	2,13
35	Test	284,0 248,3 230,9	254,4	1,50	205,7 234,0 228,8	222,8	1,05

P a t e n t k r a v :

Derivat af humant interferon- γ -polypeptid, k e n d e -
5 t e g n e t ved, at det indkodes af et rekombinant plas-
mid valgt blandt pGWC-10 og pGWE-4, som bæres af hen-
holdsvis Escherichia coli FERM BP-397 og 546, og hvor po-
lypeptiderne er henholdsvis IFN- $\gamma(\Delta 1-7, \text{Gln}^9)$ og IFN-
10 $\gamma(\Delta 1-4, \text{Gln}^9)$.

10

15

20

25

30

35

Fig. 1

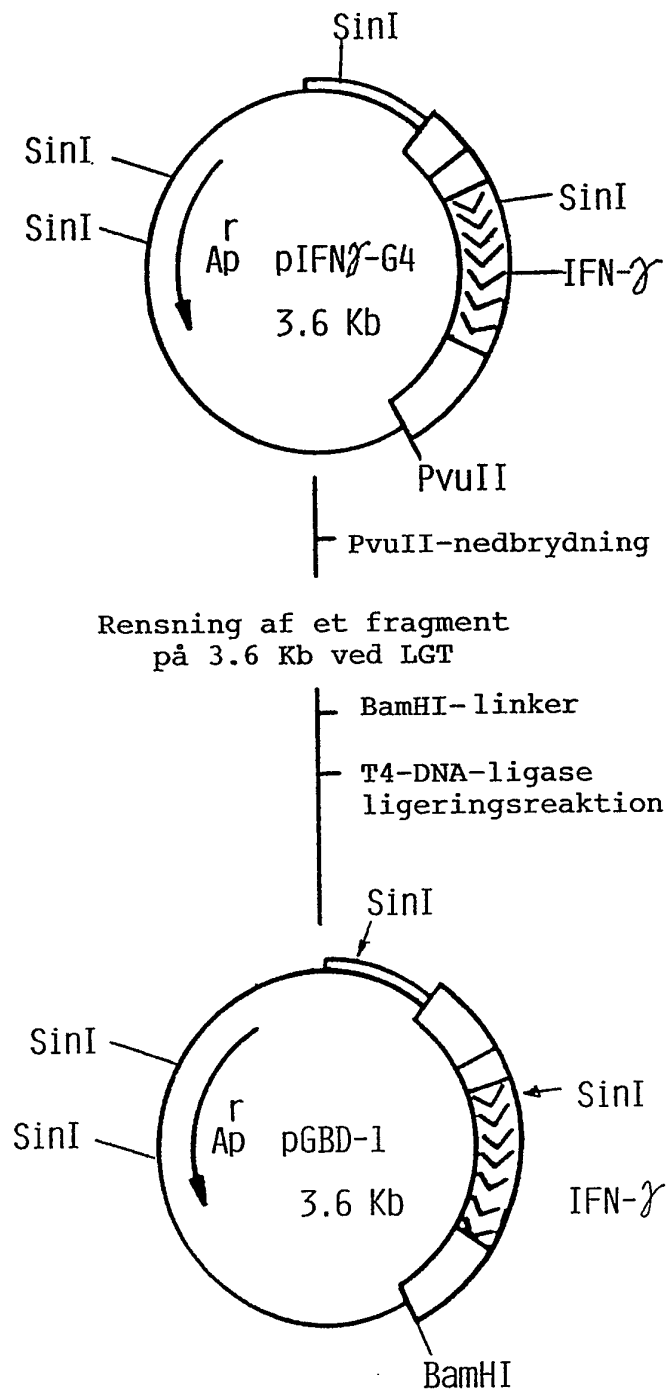


Fig. 2

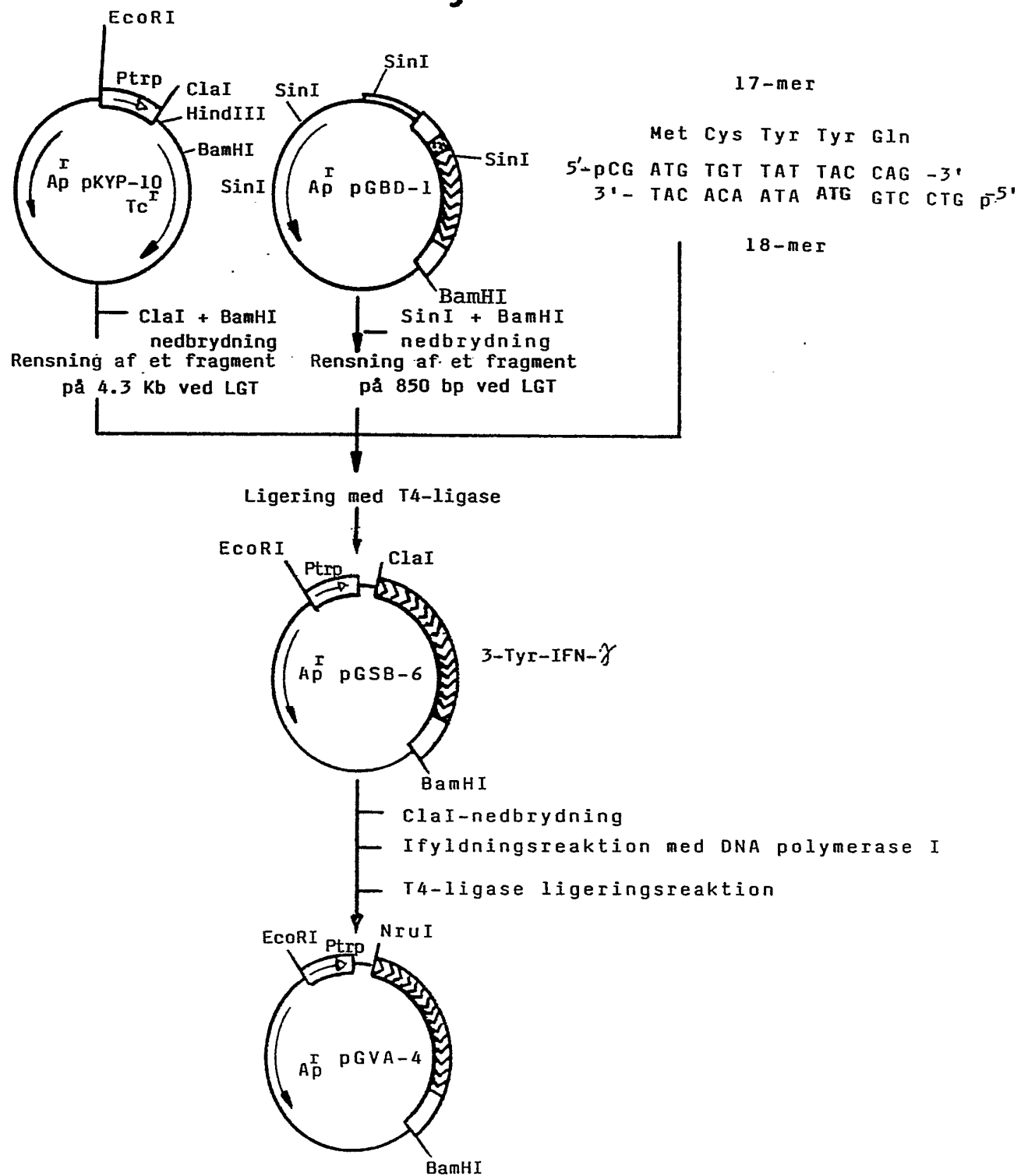


Fig.3

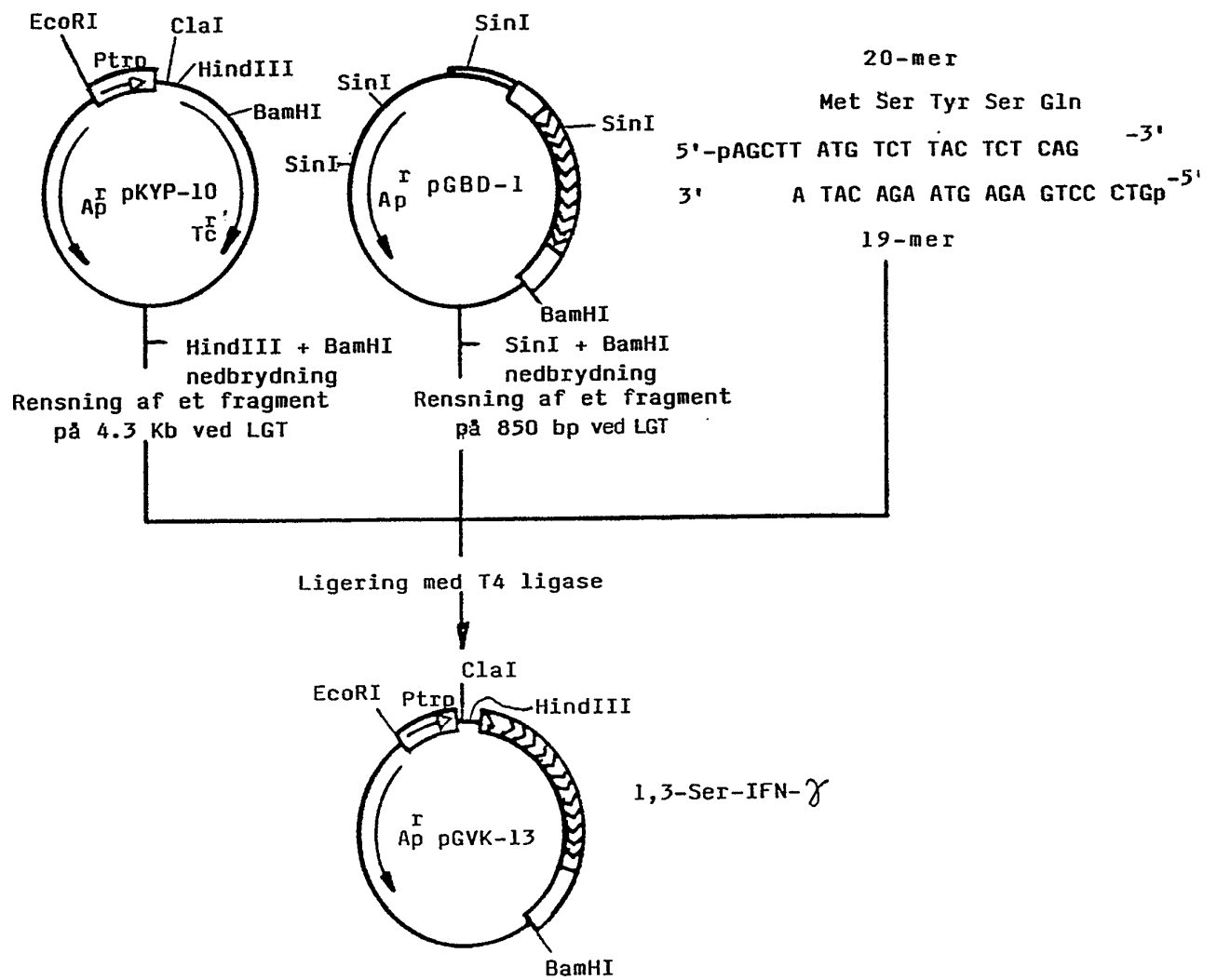


Fig. 4

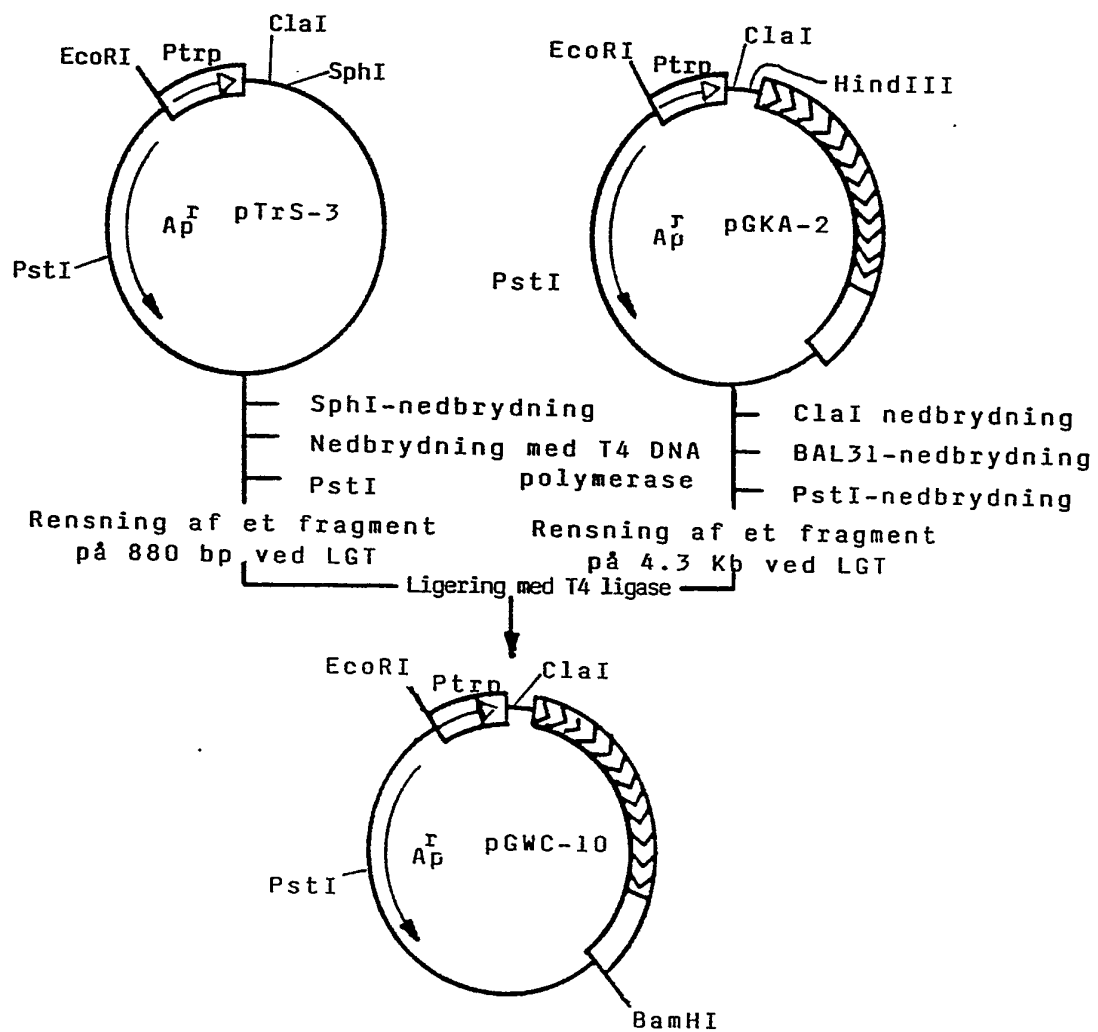


Fig.5

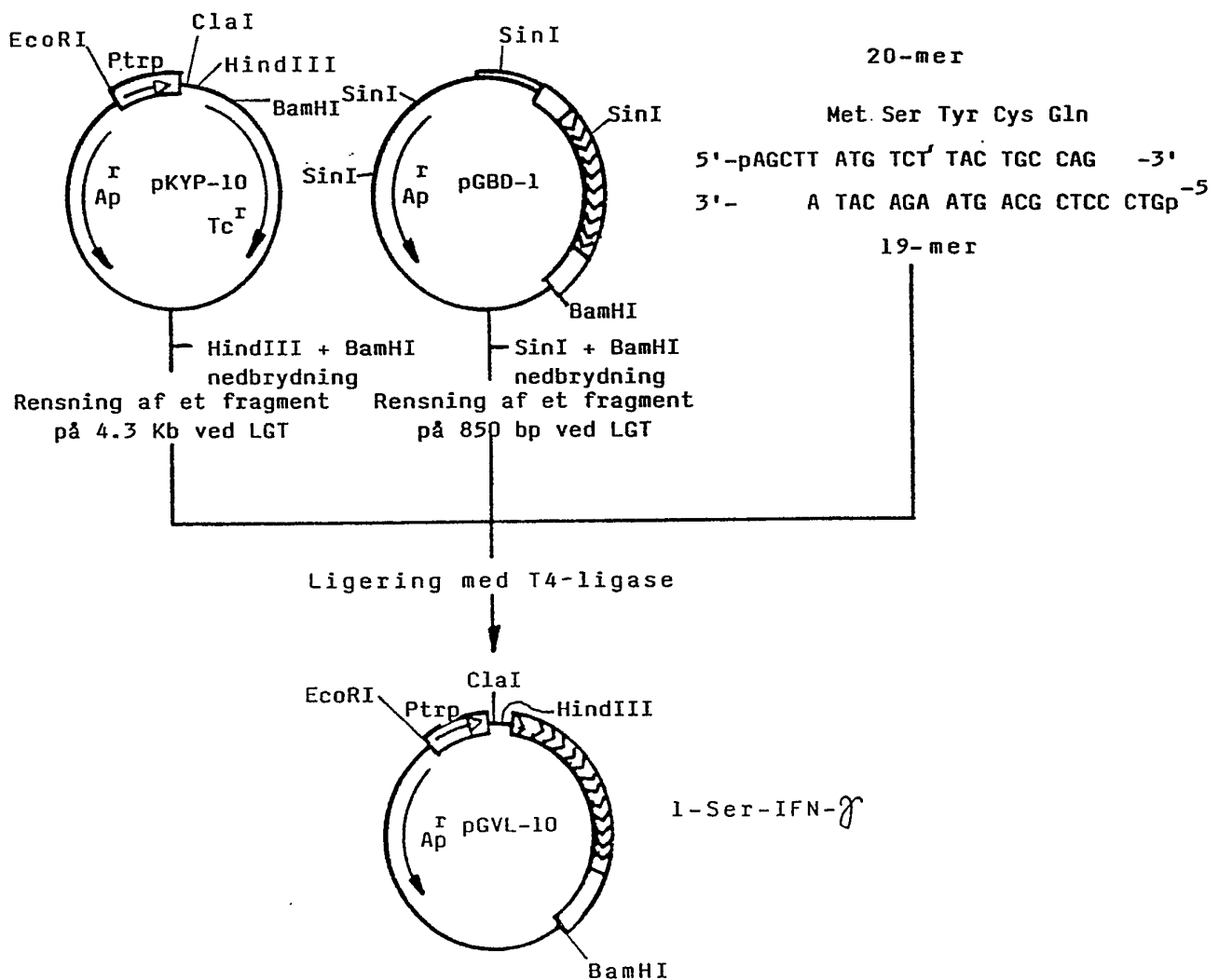


Fig. 6

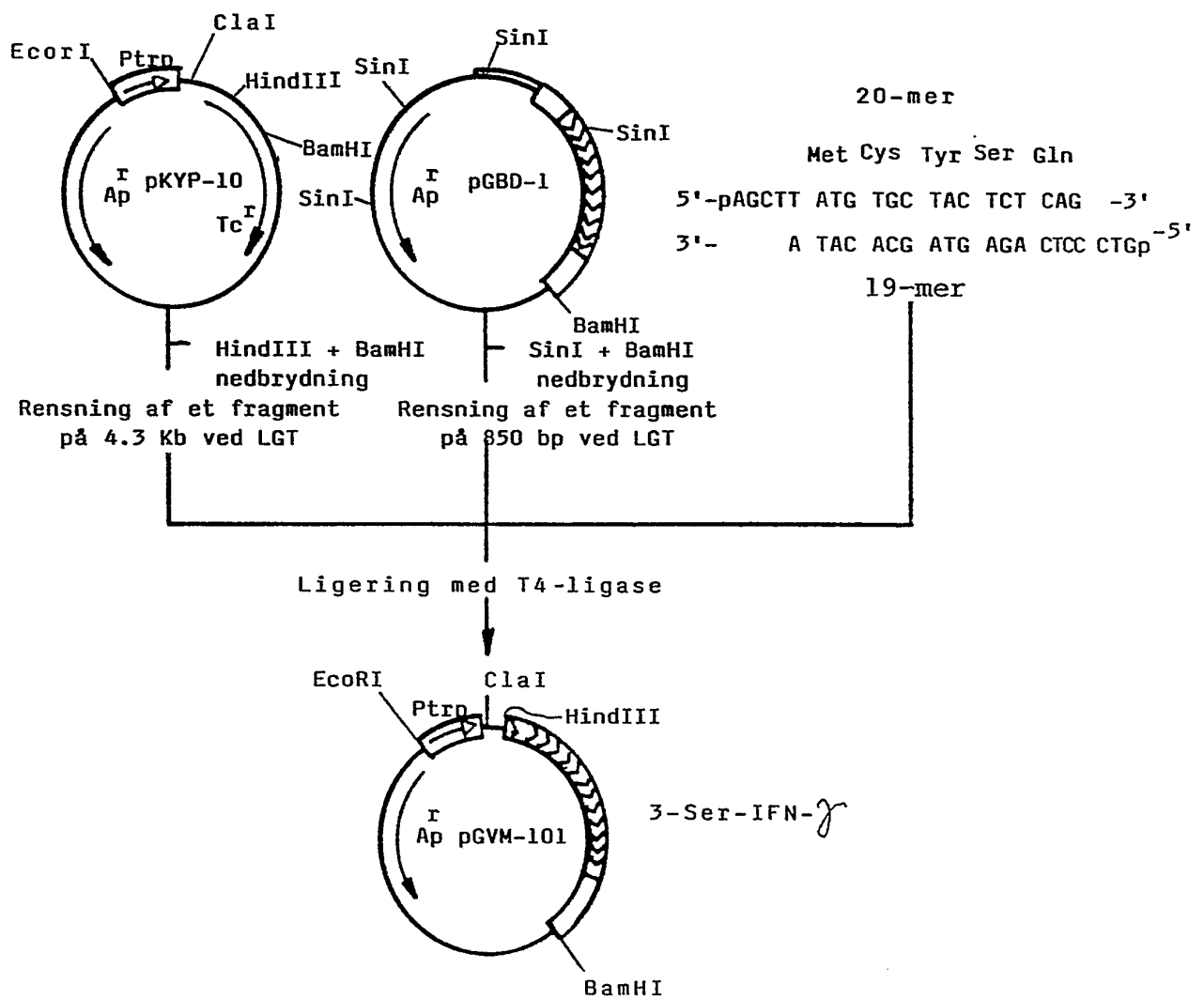


Fig. 7

