



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: C 12 N 15/00

(21) Patentansøgning nr: PA 2003 01683

(22) Indleveringsdag: 2003-11-12

(24) Løbedag: 1986-08-22

(41) Alm. tilgængelig: 2003-11-12

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-11-01

(83) Deponering af mikroorganismer.

(30) Prioritet: 1985-08-23 US 768,959 1986-03-03 US 835,548

(73) Patenthaver: Kirin-Amgen Inc., 1900 Oak Terrace Lane, Thousand Oaks, California 91320, USA

(72) Opfinder: Lawrence M. Souza, 1302 Witherspoon, Thousand Oaks, California 91360, USA

(74) Fuldmægtig: Internationalt Patent-Bureau A/S, Høje Taastrup Boulevard 23, 2630 Taastrup, Danmark

(54) Benævnelse: DNA-sekvens kodende for polypeptidet [Ala1]hpG-CSF, plasmider indeholdende sekvensen, hermed transformerede/transficerede værtsceller, fremgangsmåde til fremstilling af polypeptidet, ikke naturligt forekommende polypeptid [Ala1]hpG-CSF fremstillet således, farmaceutisk præparat med indhold deraf og anvendelse af polypeptidet til fremstilling af et lægemiddel

(57) Sammendrag:

DNA-sekvens kodende for en analog til human pluripotent granulocyt kolonistimulerende faktor ("hpG-CSF"), i hvilken den første aminosyrerest i hpG-CSF er erstattet med alanin. Denne sekvens kan inkorpore-res i autonomt replikerende plasmider eller virale vektorer til transformation af egnede prokaryotiske eller eukaryotiske værtsceller såsom pattedyrsceller. Eksprimeringsproduktet af dette, et ikke naturligt forekommende polypeptid opviser i det mindste delvis den primære strukturelle konformation og en eller flere biologiske egenskaber hørende til naturligt forekommende hpG-CSF.

(Fig: ingen)

Opfindelsen angår en DNA-sekvens, der ved ekspri-
mering i en prokaryotisk eller eukaryotisk værtscelle
koder for et polypeptidprodukt, der besidder i det mind-
ste en del af den primære struktur og en eller flere af
5 de bioilogiske egenskaber for naturligt forekommende
pluripotent granulocyt kolonistimulerende faktor
(hpG-CSF). Opfindelsen angår yderligere et i sammenhæng
med DNA-sekvensen relevant biologisk funktionelt plasmid
eller viral DNA-vektor, en prokaryotisk eller eukaryo-
10 tisk værtscelle, en fremgangsmåde til fremstilling af
polypeptiden [Ala1]hpG-CSF, dette polypeptid som ikke
naturligt forekommende, et farmaceutisk præparat inde-
holdende polypeptidet og anvendelse af polypeptidet til
fremstilling af et lægemiddel.

15 Det bloddannende (hæmatopoietiske) system hos
mennesker nydanner en række hvide blodlegemer (deri-
blandt neutrofile, makrophager og basofile/mastceller),
røde blodlegemer (erythrocyter) og størkningsfremmende
celler (megakaryocyter/blodplader). Man har anslået, at
20 det hæmatopoietiske system hos en gennemsnitlig mands-
person producerer ca. $4,5 \times 10^{11}$ granulocytter og ery-
throcyter hvert år, hvilket svarer til en fornyelse af
hele kroppens vægt. Dexter et al., BioEssays, 2, 154 -
158 (1985).

25 Man mener, at små mængder af visse hæmatopoieti-
ske vækstfaktorer er årsag til, at et lille antal "stam-
faderceller" deler sig i en række blodcellelinier, at
disse udbreder sig i så høj grad og til sidst uddiffe-
rentieres til fuldt udviklede celler i blodet. Da de
30 hæmatopoietiske vækstfaktorer er til stede i umådelig
ringe mængde, har bestemmelser og identificering af
disse faktorer hvilet på en række forsøg, som op til nu
kun skelner mellem de forskellige faktorer baseret på

deres stimulerende virkning på cellekulturer under kunstige omstændigheder. Som et resultat af dette har man frembragt et stort antal navne til betegnelse af et langt mindre antal faktorer. Som et eksempel på den 5 herskende forvirring kan man nævne, at betegnelserne IL-3, BPA, multi-CSF, HCGF, MCGF og PSF er forskellige navne, som man nu tror alle betegner samme hæmatopoietiske vækstfaktor hos mus. Metcalf, Science, 229, 16-22 (1985). Se også Burgess et al., J. Biol. Chem. 252, 10 1988 (1977), Das, et al., Blood, 58, 600 (1980), Ihle, et al., J. Immunol., 129, 2431 (1982), Nicola, et al., J. Biol. Chem., 258, 9017 (1983), Metcalf, et al., Int. J. Cancer, 30, 773 (1982), og Burgess, et al., Int. J. Cancer, 26, 647 (1980), angående forskellige vækstregulerende glycoproteiner hos mus.

Anvendelse af rekombinant genteknik har bragt en vis orden i dette kaos. For eksempel kender man nu til aminosyre- og DNA-sekvenserne for human erythropoietin, som stimulerer produktionen af erythrocyter. (Se Lin, 20 PCT ansøgning nr. 85/02510, offentliggjort 20. juni 1985). Man har også benyttet rekombinante fremgangsmåder til isolering af cDNA for en human granulocyt-macrophag kolonistimulerende faktor. Se Lee, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82, 4360-4364 (1985) og 25 Wong, et al., Science, 228, 810-814 (1985). Se også Yokota, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 81, 1070 (1984), Fung, et al., Nature, 307, 233 (1984), og Gough, et al., Nature, 309, 763 (1984) angående kloning af gener fra mus, såvel som Kawasaki, et al., Science, 230, 30 291 (1985) angående human M-CSF.

Man har vist, at der findes en human hæmatopoietisk vækstfaktor, kaldet human pluripotent kolonistimulerende faktor (hpCSF) eller pluripoietin i dyrk-

ningsmediet fra en human blærecarcinomcellelinie, kaldet 5637 og deponeret under restriktive omstændigheder hos American Type Culture Collection, Rockville, Maryland som A.T.C.C. nr. HTB-9. Man har angivet, at phCSF, 5 oprenset fra denne cellelinie, vil stimulere udbredelse og differentiering af pluripotente stamfaderceller og derved medføre produktion af alle de vigtige blodceller typer i forsøg, hvor man benytter udgangsceller fra menneskelig knoglemarv. Walte et al., Proc. Natl. Acad. Sci. Ved rensning af phCSF benyttede man: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 udfældning; anionbytterchromatografi (DEAE cellulose, DE 52); gelfiltrering (ACA54 søjle); og C18 omvendt fase højkapacitet væskechromatografi. Man angav, at et protein, der blev identificeret som phCSF og blev elueret i 15 den anden af to aktivitetstoppe i C18 reversfase HPLC-chromatografi, skulle besidde en molekylvægt (MW) på 18.000, bestemt ved hjælp af natriumdodecylsulphat (SDS)-polyacrylamid gelelektrophorese (PAGE) under anvendelse af farvning med sølv. Tidligere angav man, at 20 hpCSF skulle have et isoelektrisk punkt på 5,5 [Welte, et al., J. Cell. Biochem., Supp. 9A, 116 (1985)] og en høj differentierende aktivitet for den myelomonocytiske leukæmicellelinie WEHI-3B D^+ fra mus [Welte, et al., UCLA Symposia on Molecular and Cellular Biology, Gale, 25 et al., eds., New Series, 28 (1985)]. Tidligere studier tyder på, at den faktor man identificerer som phCSF besidder overvejende granulocyt kolonistimulerende aktivitet i de første syv dage i et humant CFU-GM forsøg.

Man har endvidere fra den humane blærecarcinom- 30 cellelinie 5637 isoleret en anden faktor, betegnet human CSF- β , som man beskriver som en konkurrent til ^{125}I -mærket granulocyt kolonistimulerende faktor (G-CSF) fra mus med hensyn til binding til WEHI-3B D^+ celler i en dosis-

respons vekselvirkning, der er identisk ved, hvad man finder ved ikke-mærket G-CSF fra mus [Nicola, et al., Nature, 314, 625-628 (1985)]. Man har tidligere meddelt, at denne sammenhæng mellem dosis og respons skulle
5 være unik for ikke-mærket G-CSF fra mus, og ikke være til stede hos sådanne faktorer som M-CSF, GM-CSF eller multi-CSF [Nicola, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 81, 3765-3769 (1984)]. Blandt CSF'er indtager CSF- β og G-CSF den særstilling, at de begge i høj grad er i stand
10 til at inducere differentiering i WEHI-3B D⁺ celler. Nicola, et al., Immunology Today, 5, 76-80 (1984). Ved høje koncentrationer stimulerer G-CSF blandede granulocyt/makrophag kolonidannende celler (Nicola, et al., (1984) se ovenfor), hvilket stemmer med tidligere resul-
15 tater, der tyder på, at der forekommer granulocytiske monocytiske og blandede granulocytiske/monocytiske og eosinophile kolonier (CFU-GEMM) efter 14 dages inkubering af humane knoglemarvskulturer med phCSF. Man har også beskrevet CSF- β som stimulerende for dannelse af
20 neutrofile granulocytkolonier i forsøg, hvor man benytter knoglemarvsceller fra mus, en egenskab, som man har benyttet til identificering af en faktor som en G-CSF. På basis af disse ligheder har man identificeret human CSF- β med G-CSF (granulocyt kolonistimulerende faktor).
25 Nicola et al., Nature, 314, 625-628 (1985).

Det lader til, i betragtning af deres fælles egenskaber, at human CSF- β ifølge Nicola, et al., se ovenfor, og hpCSF ifølge Welte, et al., se ovenfor, er den samme faktor, som man passende kan betegne som en
30 human pluripotent granulocyt-koloni-stimulerende faktor (hpG-CSF). Det ville være meget ønskeligt at kunne karakterisere og rekombinantproducere hpG-CSF på baggrund af den meddelte evne hos G-CSF fra mus til fuldstændig

at undertrykke in vitro population af WEHI-3B D⁺ leukæmiceller ved "fuldstændig normale koncentrationer", og i betragtning af, at man har rapporteret, at urensede præparationer af G-CSF fra mus ved indsprøjtning kan undertrykke eksisterende transplanterede myeloid-leukæmier hos mus. Metcalf, Science, 229, 16-22 (1985). Se også Sachs, Scientific American, 284(1), 40-47 (1986).

Hvis hpG-CSF skulle vise sig at være terapeutisk betydningsfuld, og det bliver nødvendigt at kunne fremstille det i kommercielle mængder, vil isolering fra cellekulturen næppe kunne tilvejebringe den nødvendige mængde materiale. For eksempel bør man lægge mærke til, at der synes at være restriktioner mod kommerciel udnyttelse af celler fra Human Tumor Bank, såsom blærecarcinom-cellelinie 5637 fra mennesker (A.T.C.C. HTB9), som man har angivet som kilde for naturlige hpCSF-præparater; Welte, et al., (1985), se ovenfor).

Ifølge opfindelsen tilvejebringes en DNA-sekvens, der er ejendommelig ved at kode for [Ala¹]hpG-CSF. Sådanne sekvenser kan omfatte: inkorporerede "foretrukne" kodoner til eksprimering ved udvalgte ikke-patedyrs værtsceller, tilvejebringelse af gennemskæringssteder for endo-nuclease restriktionsenzym; og tilvejebringelse af yderligere DNA-sekvenser anbragt før, inden eller efter omtalte sekvens, som gør konstruktionen af vektorer, der kan eksprimeres uden videre, lettere. Denne polypeptidanalogue til hpG-CSF afviger fra naturligt forekommende former, hvad angår identiteten af en aminosyrerest (dvs. en substitutionsanalogue, hvori en af de foreskrevne cysteinrester er erstattet med en anden rest); og der har nogle eller alle egenskaber tilfælles med de naturlige former.

En sådan DNA-sekvens ifølge opfindelsen omfatter sekvenser, der er nyttige til at sikre eksprimering i

prokaryotiske eller eukaryotiske værtsceller af polypeptidprodukter med i det mindste en del af den primære strukturelle konformation og en eller flere af de biologiske egenskaber for naturligt forekommende pluri-potent
5 granulocyt kolonistimulerende faktor, og den kan fremstilles ved fremgangsmåde ifølge Alton, et al., offentliggjort PCT ansøgning WO 83/04053.

Opfindelsen tilvejebringer også det rensede og isolerede polypeptidprodukt, der er ejendommeligt ved at
10 være et produkt af eksprimering i prokaryotiske eller eukaryotiske værter (f.eks. bakterier, gær eller dyrkede celler fra planter, insekter og pattedyr) af DNA-sekvenser ifølge opfindelsen.

I denne sammenhæng er det biologisk funktionelle
15 plasmid eller virale DNA-vektor ifølge opfindelsen ejendommeligt ved at inkludere en DNA-sekvens ifølge opfindelsen; og en prokaryotisk eller eukaryotisk værtscelle ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved at være transformeret eller transficeret med en DNA-sekvens ifølge opfindelsen på en sådan måde, at den kan eksprimere polypeptidproduktet ifølge opfindelsen.
20

Produktet fra typiske gærceller (f.eks. *Saccaromyces cerevisiae*) eller prokaryotiske værtsceller [f.eks. *Escherichia coli* (E. coli)] er fri for associa-
25 tion med noget som helst pattedyrsprotein. Produktet af mikrobeeksprimering i verte-bratceller (f.eks. pattedyr bortset fra mennesker og fugle) er fri for associering med nogen som helst former for humane proteiner. Afhængig af den anvendte vært vil polypeptiderne ifølge opfindelsen kunne være glycosylerede med pattedyrs- eller
30 andre eukaryotiske carbohydrater eller kan være ikke-glycosylerede. Polypeptider ifølge opfindelsen kan også indeholde en start methionin aminosyrerest (ved stillingen -1).

Fremgangsmåden ifølge opfindelsen til fremstilling af polypeptidproduktet ifølge opfindelsen er ejendommeligt ved det i krav 10's kendetegnende del angivne.

De farmaceutiske præparater ifølge opfindelsen er 5 ejendommelige ved at omfatte effektive mængder af polypeptidproduktet ifølge opfindelsen eller fremstillet ifølge opfindelsen sammen med passende fortyndingsmidler, adjuvanter og/eller bærere. Endelig er anvendelsen af polypeptidproduktet ifølge opfindelsen rettet på 10 fremstillet af et lægemiddel til hæmapoietisk terapi på pattedyr.

Polypeptidprodukter ifølge opfindelsen kan mærkes, idet de associeres med en påviselig markørsubstans (f.eks. radiomarkeres med ^{125}I), hvorved der tilveje- 15 bringes reagenser, der er nyttige ved bestemmelse af tilstedeværelse og mængde af human hpG-CSF i vævsprøver og i væskeformige prøver, såsom blod eller urin. DNA-produkter ifølge opfindelsen kan også mærkes med påviselige markører, såsom radiomarkører og ikke-isotop 20 markører såsom biotin), og anvendes i DNA-hybridiseringsprocesser, så man kan lokalisere positionen for human hpG-CSF-genet og/eller positionen af en hvilken som helst beslægtet genfamilie i et kromosomkort. De kan også anvendes til identifikation af uregelmæssigheder 25 vedrørende humant hpG-CSF-gen på DNA-niveauet og benyttes som genmarkører til identifikation af nabostillede gener og deres uregelmæssigheder.

Polypeptidprodukter ifølge opfindelsen kan alene eller kombineret med andre hæmatopoietiske faktorer eller 30 medikamenter være nyttige ved behandling af hæmatopoietiske afvigelser, såsom aplastisk anæmi. De kan også være nyttige ved behandling af hæmapoietiske mangler forårsaget af chemoterapi eller af stråleterapi. Chan-

cen for, at en knoglemarvstransplantation lykkes, kan f. eks. forstærkes, hvis man tilfører hpG-CSF. Behandling med heling af brandsår og behandling af bakteriel forårsaget betændelse kan også forstærkes ved tilføring af
5 hpG-CSF. Derudover kan hpG-CSF være nyttig ved behandling af leukæmi, idet det er publiceret, at den er i stand til at differentiere leukæmiceller. Welte, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82, 1526-1530 (1985) og Sachs, se ovenfor.

10 Fagmanden vil, ved at læse følgende detaljerede beskrivelse, som illustrerer udførelsen af opfindelsen, i de for tiden foretrukne udførelsesformer, kunne se adskillige aspekter og fordele ved opfindelsen.

Tegningen viser et delvis restriktionsendonuclease kort over hpG-CSF-genet forsynet med pile til belysning af strategien for sekvensering, som benyttes til
15 opnåelse af den genomiske sekvens.

Ifølge opfindelsen har man isoleret og karakteriseret DNA-sekvenser, der koder for hele polypeptidsekvensen i hpG-CSF eller dele deraf.
20

De følgende Eksempler skal illustrere opfindelsen og er især rettet på procedurer, der udføres inden identifikation af hpG-CSF cDNA og genomiske kloner, procedurer, der fører til en sådan identifikation og til sekvensering, udvikling af ekspressionssystemer, baseret
25 på cDNA, genomiske og fremstillede gener og bekræftelse af eksprimering af hpG-CSF og lignende produkter i sådanne systemer.

Mere detaljeret angår Eksempel 1 aminosyresekventering af hpG-CSF. Eksempel 2 angår fremstilling af
30 et cDNA bibliotek til gennemsøgning for kolonihydrisering. Eksempel 3 angår fremstilling af hybridiseringssonder. Eksempel 4 angår gennemsøgning for hybridise-

ring, identifikation af positive kloner, DNS-sekvensering af en positiv cDNA klon og tilvejebringelse af information om den primære strukturelle konformation (aminosyresekvens) af polypeptidet. Eksempel 5 angår identificering og sekvensering af en genomisk klon, der koder for hpG-CSF. Eksempel 6 angår konstruktion af et fremstillet gen, der koder for hpG-CSF, hvori man anvender kodoner, der hører til E. coli.

Eksempel 7 angår fremgangsmåder til konstruktion af en E. coli transformationsvektor, der indeholder DNA, der koder for hpG-CSF, anvendelse af denne vektor til prokaryotisk eksprimering af hpG-CSF og analyse af egenskaberne af de rekombinante produkter ifølge opfindelsen. Eksempel 8 angår fremgangsmåder til konstruktion af en vektor, der indeholder DNA, der koder for den opfinderiske analog til hpG-CSF, afledt fra en positiv cDNA klon, anvendelse af vektoren til transfektion af COS-1 celler og dyrkning af de transficerede celler. Eksempel 9 angår fysiske og biologiske egenskaber af rekombinante polypeptidprodukter beslægtet med et sådant ifølge opfindelsen.

Eksempel 1

25 (A) Sekvensering udført ved litteraturbekendte fremgangsmåder.

En prøve (3-4 µg, 85-90% ren SDS, sølvfarvning-PAGE) af hpG-CSF blev opnået fra Sloan Kettering Institute, New York, New York, den var isoleret og rensat ifølge Welte, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82, 1526-1530 (1985).

Den N-terminale aminosyresekvens i denne prøve af hpG-CSF blev bestemt i et første forsøg ved mikrose-

10

kvensanalyse under anvendelse af en AB407A gasfase sekvensoopdeler (Applied Biosystems, Foster City, California) til opnåelse af sekvensen, der vises i Tabel I nedenfor. I Tabellerne I-IV benyttes enkeltbogstavskoder, "X" betyder en rest, som ikke kunne bestemmes helt sikkert, og rester angivet i parentes angiver muligheder.

T A B E L I

10	1	5	10	15
	K-P-L-G-P-A-S-K-L-K-Q-(G,V,S)-G-L-X-X-X			

Ved alle dele af det forsøg, hvis resultater gives i Tabel I, var der et højt niveau for baggrundsstøj til stede, et tegn på, at prøven indeholdt mange kontaminerende ingredienser, sandsynligvis kemiske rester stammende fra rensningen. Sekvensen er kun givet af referencegrunde.

I forsøg nr. 2 benyttede man en anden prøve (5-6 µg, ca. 95% ren) fra Sloan Kettering som ved forsøg nr. 1, og man udførte sekvenseringen som ved forsøg nr. 1. Denne prøve stammede fra det samme materiale, som blev benyttet til opnåelse af fig. 4 i Welte, et al., Proc. Natl. Adac. Sci. (USA), 82, 1526-1530 (1985). Resultaterne gives i Tabel II.

T A B E L II

1	5	10	15	20
30	T-P-L-G-P-A-S-(S)-L-P-Q-(S)-M-(L)-X-K-(R)-X-X-(R)-(L)-X-			

Selvom man ved forsøg nr. 2 identificerede flere rester, opnåede man ikke en tilstrækkelig lang sikkert

identificeret sekvens, hvorfra man kunne konstruere et fornuftigt antal sonder til brug ved eftersøgning af hpG-CSF DNA. Man beregnede, at man i det mindste skulle bruge 1536 sonder, hvis an ved hjælp af sekvensen i Tabel II skulle isolere cDNA. Igen var kontaminering af prøven sandsynligvis årsag til dette.

Derefter fremskaffedes en tredje prøve (3-5 µg, ca. 40% ren) fra Sloan Kettering som ovenfor. Man opdelte denne prøve ved SDS-PAGE og underkastede den elektroblot i et forsøg på yderligere rensning. Sekvensanalyse af denne prøve gav ingen data.

(B) Sekvensopdeling ved reviderede fremgangsmåder

15 Til opnåelse af en tilstrækkelig mængde rent materiale, hvorpå man kunne udføre en tilstrækkelig nøjagtig aminosyresekvensanalyse, tilvejebragte man celler fra blærecarcinomcellelinie 5737 (underklon 1A6), som de fremstilles hos Sloan-Kettering, fra Dr. E. Platzer. 20 Cellerne blev først dyrket i Iscove's medium (GIBCO, Grand Island, New York) i småflasker til de flød sammen. Derefter forsynede man dyrkningsmedierne med trypsin og podede dem i rulleflasker (1½ småflasker/flaske), der hver indeholdt 25 ml forudbehandlet Iscove's medium under 25 der 5% CO₂. Cellerne blev dyrket natten over ved 37°C og 0,3 rpm.

Cytodex-1 småkugler (Pharmacia, Uppsala, Sverige) blev vasket og steriliseret ved følgende fremgangsmåde. Man anbragte 8 g småkugler i en flaske og tilsatte 400 30 ml PBS. Man holdt småkuglerne i suspension, idet man rystede blidt i tre timer. Man lod småkuglerne bundfælde, hældte PBS fra, rensede småkuglerne i PBS og tilsatte ny PBS. Småkuglerne blev autoklaveret i 15 minut-

ter. Før anvendelse vaskede man småkuglerne i Iscove's medium plus 10% kalvefostersserum (FCS), før man tilsatte frisk medium plus 10% FCS til opnåelse af behandlede småkugler.

- 5 Man fjernede dyrkningsmedium, bortset fra 30 ml fra hver rulleflaske og tilsatte 30 ml frisk medium plus 10% FCS og 40 ml behandlede småkugler til flaskerne. Flaskerne blev gennemboblet med 5% CO₂, og man sugede alle bobler bort. Man anbragte flaskerne i rulleanord-
- 10 ninger ved 3 rpm ½ time før man nedsatte hastigheden til 0,3 rpm. Efter tre timers forløb forsynede man yderligere en lille flaske med trypsin, og indholdet blev tilsat til alle rulleflaskerne, der indeholdt småkugler.

- Når sammenflydningen havde nået 40-50%, vaskede
- 15 man kulturen i rulleflaskerne med 50 ml PBS og rullede videre i 10 minutter, før man fjernede PBS. Cellerne blev dyrket i 48 timer i medium A [Iscove's medium med indhold af 0,2% FCS, 10⁻⁸M hydrocortison, 2 mM glutamin, 100 enheder/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin].
- 20 Derefter indhøstede man supernatanten fra kulturen, idet man centrifugerede ved 3000 rpm i 15 minutter og lagrede ved -70°C. Man tilsatte igen til kulturen medium A med indhold af 10% FCS og dyrkede i 48 timer. Dyrkningsmediet blev kasseret, hvorefter man vaskede celler-
- 25 ne med PDS som ovenfor og dyrkede i 48 timer i medium A. Man indhøstede igen supernatanten og behandlede den som tidligere beskrevet.

- Man indkoncentrerede ca. 30 l medium, der indeholdt 1A6 celler til ca. 2 l på en Millipore Pellicon
- 30 enhed, forsynet med to kassetter med afskæringer ved molekylvægt 10.000, idet man filtrerede 200 ml pr. minut og tilbageholdt ca. 1000 ml pr. minut. Koncentratet blev diafiltreret mod ca. 10 l 50 mM Tris (pH 7,8) med

- 5 samme apparat og samme hastigheder. Det diafiltrerede kon-
centrat blev med en hastighed på 40 ml pr. minut på-
sat en én liter DE cellulosesøjle, bragt i ligevægt med
50 mM Tris (pH 7,8). Efter påsætning vaskede man søjlen
5 med samme hastighed med en liter 50 mM Tris (pH 7,8) og
derefter med to liter 50 mM Tris (pH 7,8) tilsat 50 mM
NaCl. Søjlen blev derefter i rækkefølge elueret med
seks 1 liter portioner 50 mM Tris (pH 7,5), der inde-
holdt følgende koncentrationer af NaCl: 75 mM; 100 mM;
10 125 mM; 150 mM; 200 mM; og 300 mM. Man indsamlede frak-
tioner (50 ml) og sammenbragte de aktive fraktioner,
som blev indkoncentreret til 65 ml på en "Amicon ultra-
filtration stirred cell unit" forsynet med en YM5 mem-
bran. Dette koncentrat blev påsat en 2 liter Aca54 gel-
15 filtreringssøjle, bragt i ligevægt med PBS. Gennemløbet
var 80 ml/time, og man indsamlede fraktioner på 10 ml.
Aktive fraktioner blev sammenbragt og direkte påsat en
C4 "high performance liquid chromatography" (HPLC)
søjle.
- 20 Prøver, hvis rumfang var 125-850 ml, og som inde-
holdt 1-8 mg protein, hvoraf 10% var hpG-CSF, blev påsat
søjlen med en gennemstrømningshastighed på 1-4 ml/min.
Efter påsætning og en første vask med 0,1 M ammoniumace-
tat (pH 6,0-7,0) i 80% 2-propanol med en gennemstrøm-
25 ningshastighed på 1ml/minut. Man indsamlede 1 ml frak-
tioner og undersøgte for proteinindhold ved 220 nm, 260
nm og 280 nm.

- Ved denne rensning blev fraktioner, der indholdt
hpG-CSF klart adskilt (som fraktionerne 72 og 73 ud af
30 80) fra andre fraktioner, der indeholdt protein. Man
isolerede hpG-CSF (150-300 µg) af en renhed på ca. 85 ±
5% og med et udbytte på ca. 50%. Fra dette rensede ma-
teriale benyttede man 9 µg i forsøg nr. 4, en aminosy-

resekvensanalyse, hvor man påsatte proteinprøven til en TFA-aktiveret glasfiberskive uden polybren. Man udførte sekvensanalysen med en AB 470A sekvensopdeler ved fremgangsmåden ifølge Hewick, et al., J. Biol. Chem., 256, 7990-7997 (1981) og Lai (Anal. Chim. Acta, 163, 243-248 (1984)). Resultaterne af forsøg nr. 4 vises i Tabel III.

T A B E L III

10	1	5	10
	Thr- Pro - Leu - Gly - Pro - Ala - Ser - Ser - Leu -Pro-		
	15	20	
15	Gln- Ser - Phe - Leu - Leu - Lys -(Lys)- Leu -(Glu)-Glu-		
	25	30	
	Val- Arg - Lys - Ile -(Gln)- Gly - Val - Gly - Ala -Ala-		
20	Leu -X - X -		

I forsøg nr. 4 opnåede man efter 31 gennemløb (svarende til rest 31 i Tabel III) ingen yderligere signifikant oplysning om sekvensens forløb. Til opnåelse af en længere tydelig sekvens i et femte forsøg reducerede man 14 µg hpG-CSF oprenset fra behandlet dyrkningsmedium med 10 µl β-mercaptoethanol i en time ved 45°C, hvorefter man tørrede grundigt under vakuum. Proteinresten blev genopløst i 5% myresyre og påsat en polybrenbehandlet glasfiberskive. Sekvensopdelingsanalysen blev udført som ved forsøg nr. 4 ovenfor. Resultaterne fra forsøg nr. 5 gives i Tabel IV:

15

T A B E L IV

1	5	10
Thr- Pro - Leu - Gly - Pro - Ala - Ser - Ser - Leu- Pro-		
5	15	20
Gln- Ser - Phe - Leu - Leu - Lys - Cys - Leu - Glu- Gln-		
10	25	30
Val- Arg - Lys - Ile - Gln - Gly - Asp - Gly - Ala- Ala-		
	35	40
Leu- Gln - Phe - Lys - Leu - Gly - Ala - Thr - Tyr- Lys-		
15	45	
Val- Phe - Ser - Thr -(Arg)-(Phe)-(Met)- X-		

Aminosyresekvensen i Tabel IV var tilstrækkelig lang (44 rester) og nøjagtigt bestemt, at man derfra kunne konstruere sonder til opnåelse af hpG-CSF cDNA som beskrevet nedenfor.

Eksempel 2

Blandt standardfremgangsmåder til isolering af relevante cDNA sekvenser findes en fremstilling af plasmidbaserede cDNA "biblioteker", afledt fra revers transkription af mRNA, der findes i donorceller udvalgt på basis af deres eksprimering af et udvalgt gen. Når man kender væsentlige dele af aminosyresekvensen af et bestemt polypeptid, kan man benytte mærkede, enkeltstrenge DNA sondesekvenser, der duplikerer en sekvens, som man antager findes i det relevante cDNA ved en DNA/DNA hybridiseringsprocedure, som man udfører på klonede ko-

5 pier af cDNA, som er blevet denatureret, så det forekommer på enkeltstrengsform. Weissman, et al., US patent nr. 4 394 443; Wallace, et al., Nucleic Acids Res., 6, 3543-3557 (1979), og Reyes, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 79, 3270-3274 (1982), og Jaye, et al., Nucleic Acids Res., 11, 2325-2335 (1983). Se også US patent nr. 4 358 535, Falkow, et al., angående DNA/DNA hybridiseringsprocedure ved diagnose; og Davis, et al., "A Manual for Genetic Engineering, Advanced Bacterial Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1980) siderne 55-58 og 174-176 angående teknikken for koloni og plaquehybridisering.

10 Man ekstraherede al RNA fra ca. 1 g celler fra en blærecarcinomcellelinie 5637 (IA6) under anvendelse af guanidiniumthiocyanat til kvantitativ isolering af ubeskadiget RNA. [Chirgwin, et al., Biochemistry, 18, 5294-5299 (1979)].

Den sterile vandige RNA opløsning indeholdt al RNA fra IA6 cellerne. For tilvejebringelse af messenger RNA alene ud fra opløsningen af total RNA lod man denne opløsning passere en søjle, der indeholdt oligodesoxythymidylat [oligo(dT)] (Collaborative Research, Inc., Waltham, Massachusetts). Poly-adenylerede (poly-A⁺) endestykker, der er karakteristiske for messenger RNA, 25 bindes til søjlen, hvorimod ribosom RNA elueres. Som et resultat af denne fremgangsmåde kunne man isolere ca. 90 µg poly-adenyleret messenger RNA (poly-A⁺ mRNA). Det isolerede poly-A⁺ messenger RNA blev forbehandlet med methylkviksølvhydroxid (Alpha Ventron, Danvers, Massachusetts) ved en slutkoncentration på 4 mM i fem minutter ved stuetemperatur før anvendelse i en cDNA reaktion. Behandlingen med methylkviksølvhydroxid denaturerer vekselvirkninger med messenger RNA, både internt 30

og med kontaminerende molekyler, som blokerer translation. Payvar, et al., J. Biol. Chem., 258, 7636-7642 (1979).

Ifølge Okayama-fremgangsmåden [Okayama, et al.,
5 Molecular & Cellular Biology, 2, 161-170 (1982)] fremstillede man en cDNA bank, idet man benyttede mRNA, opnået fra IA6 celler. Man transformerede cDNA, idet man inkuberede i en værtsmikroorganisme E. coli K-12 stamme HB101 til forøgelse af mængden.

10

Eksempel 3

Hybridiseringssonder, konstrueret på basis af den terminale aminosyresekvens for hpG-CSF ifølge Tabel IV, bestod af et sæt af 24 oligonucleotider, hver med en
15 længde på 23 baser og med et indhold på tre inosinrester. Sondeoligonucleotiderne blev fremstillet ved fremgangsmåden ifølge Caruthers, et al., Genetic Engineering, 4, 1-18 (1982) og mærket med γ -³²P ATP, idet de blev kinaseret med polynucleotidkinase. Sondeoli-
20 gonucleotiderne, der svarede til messenger RNA for resterne 23-30 i sekvensen i Tabel IV, illustreres i Tabel V:

T A B E L V

25

hpG-CSF sonder

5' GC IGC ICC A^{TC} ICC T^{TG} GAT T^{TT}3'

30

Antagelsen af neutralitet for I-baserne var baseret på offentliggjorte arbejder af Takahashi, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82, 1931-1935 (1985) og Ohtsuka, et al., J. Biol. Chem., 260, 2605-2608 (1985).

Inosin kan imidlertid have en destabiliserende effekt, hvis det baseparres med G eller T. Hos Takahashi, et al., synes inosiner at besidde en neutral effekt, fordi de som gruppe i gennemsnit opnår næsten neutralitet (f.eks. hvis tre med fordel parrer med C, og to ikke med fordel parrer med T).

Til afprøvning af virkningen af baseparring mellem I og G konstruerede man kontroleksperimenter ved hjælp af en N-myc gensekvens og klon. Sekvensen, der var udplukket fra N-myc genet, havde samme total indhold af G og C ved de første to stillinger i hvert kodon, som var bestemt for hpG-CSF sonderne. N-myc prøvesonderne var af samme længde, indeholdt I i samme relative stillinger og havde potentielt samme gennemsnitværdi for T_m (62-66°C, idet de tre eller fire inosinrester, der fandtes, ikke blev talt med) som hpG-CSF sonderne.

Man konstruerede to grupper N-myc prøvesonder ved fremgangsmåden ifølge Caruthers, et al., se ovenfor. Sæt I, som illustreret i Tabel VI, inkluderede: 1, en 23 mer med fuldstændig tilpasning; 2, i hvilken tre tredie-positions C'er var erstattet med I'er under dannelse af det værst mulige tilfælde ved tilsætning af I; og 3, i hvilken fire tredie-positions C'er var erstattet med I'er. Den anden gruppe testsonder var konstrueret, så den repræsenterede en mere tilfældig fordeling af inosinbasepar, hvorved man kunne opnå en baseparrende virkning, der i gennemsnit var neutral. Sæt II, som illustreret i Tabel VI, inkluderede; 4, med indhold af to I'er, der vil danne basepar med C og I med G; og 5, identisk med 4, idet der er tilsat et yderligere I:G basepar.

T A B E L VI

1. 5' CAC AAC TAT GCC GCC CCC TCC CC^{3'}
- 5 2. 5' CAC AAC TAT GCI GCC CCI YCI CC^{3'}
3. 5' CAI AAC TAT GCI GCC CCI TCI CC^{3'}
4. 5' AAC GAG CTG TGI GGC AGI CCI GC^{3'}
- 10 5. 5' AAI GAG CTG TGI GGC AGI CCI GC^{3'}

Fem replikafiltre, der indeholdt N-myc DNA sekvenser og sekvenser fra DNA fra kyllingevæksthormon (som en negativ kontrol), blev opbedet i to timer ved 80°C i en vakuumovn før hybridiseringen. Alle filtre blev hybridiseret som beskrevet i Eksempel 4 for hpG-CSF sonderne, med undtagelse af at hybridiseringsperioden kun var seks timer. Filtre blev vasket tre gange ved 20 stuetemperatur og en gang ved 45°C, 10 minutter hver gang. Filtrene blev kontrolleret med en Geigertæller.

Filteret, der repræsenterede en N-myc sonde 3, gav et meget svagt signal i forhold til de andre fire filtre med sonder og blev ikke vasket yderligere. Efter 25 ti minutters vask ved 50°C gav Geigertælleren følgende procentiske signal, idet sonde 1 sættes til 100%; sonde 2 20%; sonde 3 (45°C), 2%; sonde 4 92%; og sonde 5 75%. Efter vask ved 55°C var procentværdierne: sonde 2 16%; sonde 4 100%; og sonde 5 80%. En sluttelig vask ved 30 60°C gav følgende procentværdier: Sonde 2 1,6%; sonde 4 90%, og sonde 5 70%.

Således observerer man under tilstedeværelse af tre I'er, som i sonderne 2 og 4 en op til 60-gange så

stor forskel i signal, når man nærmer sig den teoretiske værdi for T_m (I ikke inkluderet i beregningen) [baseret på det værste tilfælde for baseparring med I (sonde 2) og et relativt neutralt tilfælde med baseparring med I (sonde 4)].

De standardiseringsoplysninger, som man indvandt ved N-myc prøvehybridiseringerne, blev udnyttet, når man skulle vaske og kontrollere hpG-CFS hybridiseringen som nedenfor til at vurdere, i hvor høj grad man kunne have tillid til resultaterne, når man benyttede en mindre stringent vaskeprocedure.

Eksempel 4

Ved fremgangsmåden ifølge Hanahan, et al., J. Mol. Biol. 166, 557-580 (1983) udsprede man bakterier, der indeholdt rekombinanter med cDNA indsætningsstykker, som fremstillet i Eksempel 2 på 24 nitrocellulosefiltre (Millipore, Bedford, Massachusetts), anbragt på agarplader. Man inkuberede derefter pladerne til opnåelse af ca. 150 000 kolonier, som blev replikaplattede på 24 andre nitrocellulosefiltre. Man inkuberede replikafiltrene, indtil man opnåede adskilte kolonier. Bakterierne på filtrene blev lyserede på Whatman 3 MM papir, der var næsten mættet med natriumhydroxid (0,5 M) i ti minutter og derefter plettet med Tris (1M) i to minutter, hvorefter man plettede med Tris (0,5 M) med indhold af NaCl (1,5 M) i ti minutter. Når filtrene var næsten tørre, lod man dem opvarme i to timer ved 80°C i en vakuumovn, før de skulle hybridiseres med nucleinsyre. [Wahl, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76, 3683-3687 (1979)] ; og Maniatis, et al., Cell, 81, 163-182 (1976).

Man forhybridiserede filtrene i to timer ved 65°C i 750 ml 10 x Denhardt, 0,2% SDS og 6 x SSC. Man

rensede filtrene i 6 x SSC og anbragte dem fire sammen, hvorefter man hybridiserede 14 timer i 6 x SSC og 10 x Denhardt. Der var ca. 15 ml opløsning i hybridiseringsbeholderen med indhold af 50×10^6 cpm af ^{32}P -mærket sonde (oligonucleotider).

Efter hybridisering vaskede man filtrene tre gange i 6 x SSC (1 liter/vask) ved stuetemperatur, 10 minutter hver gang. Man vaskede filtrene to gange ved 45°C i 15 minutter, en gang ved 50°C i 15 minutter og en gang ved 55°C i 15 minutter, idet man benyttede 1 liter 6X SSC hver gang. Man autoradiograferede filtrene ved -70°C i to timer under benyttelse af en forstærkende skærm og Kodak XAR-2 film. På denne autoradiograf var der 40-50 positive signaler, deriblandt fem meget kraftige signaler.

Arealet, der indeholdt de stærkeste fem signaler og yderligere fem positive signaler, blev skrabet fra udgangspladerne og igen udplattet for en anden gennemsøgning ved hjælp af samme sondeblanding og samme betingelser. Vaskningen afveg, idet man vaskede ved høj temperatur to gange ved 55°C i 15 minutter, og en gang ved 60°C i 15 minutter. På baggrund af studiet af N-myc sonden i Eksempel 3 satte man slut vasketemperaturen i den anden gennemsøgning i vejret, idet det kombinerede smeltepunkt for de 24 23-mere var $60-68^\circ\text{C}$, som i N-myc sonderne. Umiddelbart efter den anden vask ved 55°C lod man filtrene autoradiografere i fugtig tilstand. En sammenligning af denne autoradiografi med en anden autoradiografi, optaget samme tidspunkt efter slutvasken ved 60°C , viste at kun to af de ti afprøvede kloner ikke led et kraftigt tab i signalstyrke, når man forøgede temperaturen fra $55-60^\circ\text{C}$. Man kunne senere vise, at disse to kloner var af næsten identisk længde og besad næsten

5 samme mønster for restriktionsendonucleaser. Man udvalgte en klon, betegnet Ppo2, til sekvensopdeling.

Man udførte sekvensopdelingen af den rekombinante hpG-CSF cDNA klon Ppo2, opnået ved den ovennævnte fremgangsmåde ved didesoxymetoden ifølge Sanger, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 74, 5463-5467 (1977). M-13 strengen med enkeltstreng DNA blev benyttet som kloningsvektor og leverede enkeltstreng DNA skabeloner til de dobbeltstrengede cDNA kloner. Sanger, et al. 10 fremgangsmåden gav den sekvens, der vises i Tabel VII sammen med den tilsvarende aminosyresekvens og en komplementær streng i den region, der koder for polypeptid.

Bind III

5' - AGCTTGACTCAGCGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGGCGGGGG [fNNNNN] HindIII

-12	-10	+1
Leu Trp His Ser Ala Leu Trp Thr Val Gln Glu Ala Thr Pro Leu Gly Pro CTG TGG CAC CAG AGT GCA CTC TGC ACA GTG CAG GAA GCC ACC CCT CTG GGC CCT GAC ACC GTG TCA CGT GAG ACC TGT CAC GTC CTT CGG TGG GGG GAC CCG GGA		Apal
Hqial		
Ala Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln Val Arg Lys Ile Gln GCC AGC TCC CTG CCC CAG CAG AGC TTC CTG CTC AAG TGC TTA GAG CAA GTG AGG AAG ATC CAG CGG TCG AGG GAC GGC GTC TCG AAG GAG GAG TTC ACG AAT CTC GTT CAC TCC TTC TAG GTC	20	
Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu GGC GAT GGC GCA GCG CTC CAG GAG AAG AAG CTG TGT TGC ACC ACC TAC TAC AAG CTG TGC CAC CCC GAG CCG CTA CCG CGT CGC CGC GAG GTC CTC TTC GAC ACA CCG TGG ATG ATG TTC GAC ACG GTG GGG CTC	30	
Glu Leu Val Leu Leu Gly His Ser Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro GAG CTG GTG CAC GAC GAC GAG CAC TCT TCT CTG GGC ATC ATC CCC TGG GCT CCC CTG AGC AGC TGC CCC CTC GAC CAC GAC GAG CCT GTG AGA GAC CCG CCG TAG GGG ACC CGA GGG GAC TCG TCG ACG GGG	50	
Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Leu Glu Ser Gln Leu Phe Leu Tyr AGC CAG GCC CTG CAG CTG GCA GGC GGC TGC TGC AGC CAA CTC CAT AGC GGC GGC CTT TTC CTC TAC TCG GTC CCG GAC GTC GAC CCG CGT CCG CCG AAC TCG GTA TCG CCG CCG GAA AAG GAG ATG	70	
Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile Ser Pro Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr CAG GGG CTC CTG CAG GCC CAG GGC GAA GGG ATC TCC CCC CCG GAG TTG GGT CCC ACC TTT GAC ACA GTC CCC GAG GAC CTT CCG GAC CTT CCC TAG AGG GGG GGC CCA CCA AAC CTC AAC GGG TGG AAC CTG TGT	90	
		100

T A B E L VII (fortsat)

110	Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly	
	CTG CAG CTG GAC GTC GCC GAC TTT GCC ACC ACC ATC TGG CAG CAG ATG GAA GAA CTG GGA	
	GAC GTC GAC CTG CAG CGG CTG AAA CGG TGG TAG ACC GTC GTG TAC CTT CTT GAC CCT	
120		
130	Met Ala Pro Ala Gln Leu Gln Thr Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln	
	ATG GCC CCT GCC GAC GTC CAG CCC ACC ACC GGT GCC ATG CCG GCC TTC GCC TCT GCT TTC CAG	
	TAC CGG GGA CGG GAC GTC GGC TGG TGG CTC CCA CGG TAC GGC CGG AAG CGG AGA CGA AAG GTC	
140		
150	Arg Arg Ala Gly Val Leu Val Leu Val Ser His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr	
	CGC CGG GCA GGA GGC GTC CTG GTC GTC GGT GCC TCC CAT CTG CAG AGC TTC CTG GAG GTG TCG TAC	
	GCG GCC CGT CCT CCC CAG GAC CAA CGG AGG GTA GAC GTC TCG AAG GAC CTC CAC AGC ATG	
160		
170	Arg Val Leu Arg His Leu Ala Gln Pro OP	
	CGC GTT CTA CGC CAC CTT GCC CAG CCC TGA GCC AAG CCC TCC CCA TCC CAT GTA TTT ATC	
	CGC CAA GAT GCG GTG GAA CGG GTC GGG ACT	
174		
	TCT ATT TAA TAT TTA TGT CTA TTT AAG CCT CAT ATT TAA AGA CAG GGA AGA GCA GAA CGG	
	AGC CCC AGG CCT CTG TGT CCT TCC CTG CAT TTC TGA GTT TCA TTC TCC TGC CTG TAG CAG	
	<u>StuI</u>	
	TGA GAA AAA GCT CCT GTC CTC CCA TCC CCT GGA CTG GGA GGT AGA TAG GTA AAT ACC AAG	
	TAT TTA TTA CTA TGA CTG CTC CCC AGC CCT GGC TCT GCA ATG GGC ACT GGG ATG AGC CGC	
	TGT GAG CCC CTG GTC AGG GTC CCC ACC TGG GAC CCT TGA GAG TAT CAG GTC TCC CAC	

T A B E L VII (fortsat)

GTG GGA GAC AAG AAA TCC CTG TTT AAT ATT TAA ACA GCA GTG TTC CCC ATC TGG GTC CTT
 GCA CCC CTC ACT CTG GCC TCA GCC GAC TGC ACA GCG GCC CCT GCA TCC CCT TGG CTG TGA
 GGC CCC TGG ACA AGC AGA GGT GGC CAG AGC TGG GAG GCA TGG CCC TGG GGT CCC ACG AAT
 TTG CTG GGG AAT CTC GTT TTT CTT AAG ACT TTT GGG ACA TGG TTT GAC TCC CGA ACA
 TCA CCG ACG TGT CTC CTG TTT TTC TGG GTG GCC TCG GGA CAC CTG CCC TGC CCC CAC GAG
 GGT CAG GAC TGT GAC TCT TTT TAG GGC CAG GCA GGT GCC TGG ACA TTT GCC TTG CTG GAC

GGG GAC TGG GGA TGT GGG AGG GAG CAG ACA GGA GGA ATC ATG TCA GGC CTG TGT GTG AAA
 GGA AGC TCC ACT GTC ACC CTC CAC CTC TTC ACC CCC CAC TCA CCA GTG TCC CCT CCA CTG
 TCA CAT TGT AAC TGA ACT TCA GGA TAA TAA AGT GTT TGC CTC CA

[f150-200 base poly A plus 25-30 baser af plasmid DNA
før et PvuII restriktionssted]-3'

De følgende karakteristika for sekvensen i Tabel VII bør bemærkes. I 5'enden af sekvensen vises baser, der svarer til, hvad man finder i en poly G cDNA sammenbinder. Derefter findes ca. fem baser (betegnet "N"),
5 hvis sekvens ikke kunne bestemmes nøjagtigt ved Sanger, et al. fremgangsmåden på grund af den lange G sekvens, der kommer umiddelbart forud. Sekvensen, der følger, udviser en serie af 12 kodoner, der koder for en del af en antagen ledersekvens for polypeptidet. På basis af
10 korrespondens med den terminale aminosyresekvens i naturligt isoleret hpCSF, beskrevet i Eksempel 1, er den første threoninrest i den antagne "færdige" form for hpG-CSF betegnet med +1. Derefter ses det, at færdig hpG-CSF omfatter 174 aminosyrerester, som vist. Efter
15 "stop" kodonet (OP kodonet, TGA) forekommer omtrent 856 baser, der tilhører en ikke translateret 3' sekvens og en række A'er i poly A "halen". Unikke HgiAI og ApaI restriktionsendonucleasesteder, så vel som to StuI steder (diskuteret nedenfor i forbindelse med konstruktion
20 af et procaryotisk og eucaryotisk eksprimeringsystem) vises også i Tabel VII. Da der ikke findes asparaginrester i polypeptidet, er der tilsyneladende ingen positioner, hvor man kan N-glycosylere. De understregede seks baser nær ved enden af den 3' ikke-translaterede
25 sekvens repræsenterer et muligt polyadenyleringssted.

Man bør bemærke, at begge de to yderligere cDNA kloner, identificeret ved hybridiseringsfremgangsmåden beskrevet ovenfor ud af total 450 000 kloner, ikke inkluderer DNA, der kodede for hele leader-sekvensen fra
30 transkriptions-initieringsstedet og fremad. Alle tre hpG-CSF kloner terminerede faktisk 5' regionen på nøjagtigt samme sted, et tegn på at den sekundære struktur i det transkriberede mRNA i alvorlig grad hindrer dannel-

sen af cDNA hinsides dette sted. I praksis ville derfor en cDNA eksprimeringsscreening, som beskrevet hos Okayama, et al., Mol. and Cell. Biol., 3, 280-289 (1983) og som blev benyttet til at isolere GM-CSF hos Wong, et al., Science, 228, 810-814 (1985) uden videre ikke være benyttet til isolering af hpCSF DNA, da sådanne isoleringssystemer almindeligvis er afhængig af tilstedeværelsen af transkriberet cDNA i fuld længde i de kloner, der bliver undersøgt.

- 10 Den ovenfor nævnte sekvens er ikke direkte i stand til at sikre direkte eksprimering af hpG-CSF i en mikrobevært. Til opnåelse af en sådan eksprimering skal hpG-CSF koderegionen forsynes med et initial ATG kodon og sekvensen skal anbringes i en transformationsvektor i
- 15 en position, hvor det kontrolleres af en passende promotor/regulator DNA sekvens.

Eksempel 5

- I dette Eksempel benyttede man cDNA, der kodede
- 20 for hpG-CSF som isoleret i det foregående Eksempel til at gennemsnøge en genomisk klon. Et phag λ menneskefosterlever genomisk bibliotek [fremstillet ved fremgangsmåden ifølge Lawn, et al., Cell, 15, 1157-1174 (1978) og opnået fra T. Maniatis] blev gennemsnøgt ved hjælp af en
- 25 haktranslateret sonde, bestående af to hpG-CSF fragmenter, isoleret ved fordøjelse med HgiAI og StuI (HgiAI til StuI, 649 basepar; StuI til StuI, 639 basepar). Ialt ca. 500 000 phager blev udplattet på 12 (15 cm) petriskåle, og de dannede pletter blev udtaget derfra og
- 30 sondehybridiseret ved hjælp af Benton/Davison fremgangsmåden [Benton, et al., Science, 196, 180 (1977)]. Man observerede ialt 12 positive kloner. Tre kloner (1-3), der gav det stærkeste signal ved autoradiografi i en

anden gennemsøgning, blev dyrket i 1 liter kulturer og afbildet ved fordøjelse med restriktionsenzymmer og Southern blot under anvendelse af en radiomærket 24-mer oligonucleotid (kinaseret med γ - ^{32}P ATP)

- 5 5'CTGCACTGTCCAGAGTGCACTGTG3'. Afbildingsresultaterne viste, at isolaterne 1 og 3 var identiske, og 2 indeholdt 2000 yderligere baser 5'stillet til hpG-CSF genet. Derfor benyttede man klon 2 til yderligere karakterisering. Man fordøjede DNA fra klon 2 med R1 til frigivelse af et
- 10 8500 bp fragment med indhold af hpG-CSF, dette blev derefter underklonet i pBR322 og yderligere underkastet afbildning ved hjælp af fordøjelse med restriktionendonuclease, Southern Blot, M13 underkloning og sekvensopdeling. Den opnåede sekvens vises i Tabel VIII.

T A B E L VIII

GGGGACAGGCTTGAGAAATCCCAAGGAGAGGGGCAAGGACACTGCCCCCGCAAGTCTGCCAGAGCAGAGAGGGAGACCCCGACTCAGCTGCCACTTCCC	100
CACAGGCTCGTGCCGCTTCCAGGCGTCTATCAGCGGCTTGTTCAGCTGTCTGTCTTCAAACA CTCTGGGGCCATTTCAGGCCTGGGTGGGCAGC	200
GGGAGGAAGGAGTTTGAGGGGGGCAAGGCGACGTCAAAGGAGGATCCACAAATTTCAAAAACCTTTCGCAAAACAGCTTTTGTGTTCCAAACCCC	300
CCTGCATTGTCTTGGACACCAAATTTGCATAAAATCCTGGGAAGTTATTACTAAGCCTTAGTCGTGGGCCCCCAGGTAATTTCTCCAGGCCTCCATGGGT	400
-30	
TATGTATAAAGGGCCCCCTAGAGCTGGGGCCCCAAACAGCCCCGAGCCCTGCAGCCCCAGCCCCACCCAGACCCCATGGCTGGACCTGCCACCCAGAGCCCCCA	500
-20 -18	
etLysLeuMeta	
TGAAGCTGATGSGTGAGTGTCTTGGCCCCAGGATGGGAGAGCCGCCCTGCCCTGGCATGGGAGGAGGCTGGTGTGACAGAGGGGCTGGGGATCCCCCGTTCT	600
-16	
GGGAATGGGGATTAAAGGCCACCCAGTGTCCCCGAGAGGGCCCTCAGGTGGTAGGGAACAGCATGTCTCCTGAGCCCCGCTCTGTCTCCCCAGCCCTGCAGCTGC	700
laLeuGlnLeuL	

T A B E L VIII (fortsat)

-10	-1 +1	10	20
euLeuTrpHisSerAlaLeuTrpThrValGlnGluAlaThrProLeuGlyProAlaSerSerLeuProGlnSerPheLeuLeuLysCysLeuGluGlnVa	TGCTGTGGCACAGTGCACCTCTGGACAGTGCAGGAAGCCACCCCTGGCCCTGCCAGCTCCTGCCCCCAGAGCTTCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGT		800
lArgLysIleGlnGlyAspGlyAlaAlaLeuGlnGluLysLeu	GAGGAAGATCCAGGGCGGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGGTGAGTGAGGGCTGTGGAGGGAAGCCCGGTGGGGAGAGCTAAGGGG	30	900
GATGGAACTGCAGGGCCCAACATCCTCTGGAAGGGACATGGGAGAATATTAGGAGCAGTGGAGCTGGGGAAGGCTGGGAAGGGACTTGGGGAGGAGGACCT	TGGTGGGGACAGTGCTCGGGAGGGCTGGCTGGGATGGGAGTGGAGGCATCACATTTCAGGAGAAAGGCAAGGGCCCCCTGTGATCAGAGAGTGGGGGTG	35	1000
CAGGGCAGAGAGGAACTGAACAGCCCTGGCAGGACATGGAGGGAGGGGAAAGACCAGAGAGTCCGGGAGGACCCCGGGAAGGAGCGCGGCCACGGC	GAGTCTCACTCAGCATCCTTCCATCCCCCAGTGTGCCACCTACAAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTCGGACACTCTCTGCGGCATCCCCCTGGG	40	1100
		50	1200
			1300

T A B E L VIII (fortsat)

60	70 71	
laProLeuSerSerCysProSerGlnAlaLeuGlnLeu		
CTCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGTGAGTGTCAAGGAAGGATAAGGCTAATGAGGAGGGGAAGGAGAGGAAACACCCCATGGG		1400
	72	
	AlaGlyCysLeuSerGln	
CTCCCCCATGTCTCCAGGTTCCAAGCTGGGGGCTTGACGTATCTCAGGCAGCACCCCCCTAACTCTTCCGCTCTGTCTCACAGGCAGGCTGCTTGAGCCAA		1500
	32	
80	90	110
LeuHisSerGlyLeuPheLeuTyrGlnGlyLeuGlnAlaLeuGluGlyIleSerProGluLeuGlyProThrLeuAspThrLeuGlnLeuAspVala		
CTCCATAGCGGCCTTTTCCTCTACCCAGGGGCTCCTGCAGGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCGAGTTGGGTCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCG		1600
	120	
laAspPheAlaThrThrIleTrpGlnGln		
CCGACTTTGCCACCACTCTGGCAGCAGGTGAGCCCTTGTGGGCAGGGTGGCCCAAGTGTGTGGCATTTCTGGGCACCCACAGCCGGCCCTGTGTATGG		1700
	121	
	MetGluG	
GGCCTGTCCATGCTGTACGGCCCCCAGCATTTCCCTCATTTTGTATTAACGCCCACTCAGAAGGGCCCCAACCACTGATCACAGCTTTTCCCCCACAGATGGAAG		1800

T A B E L VIII (fortsat)

	130	140	150	1900
	160	170	174	
luLeuGlyMetAlaProAlaLeuGlnProThrGlnGlyAlaMetProAlaPheAlaSerAlaPheGlnArgAlaGlyGlyValLeuValAlaSerHi				
AACTGGGAATGGCCCTGGCCCTGCAGCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCCTCTGCTTCCAGGCCGGCAGGAGGGTCCCTGGTTGCCCTCCCA				
sLeuGlnSerPheLeuGluValSerTyrArgValLeuArgHisLeuAlaGlnProOP				2000
TCTGCAGAGCTTCTCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTACGCCACCTTGCCCCAGCCCTGAGCCAAGCCCTCCCCCATCCCATGTATTTATCTCTATTTAATAT				2100
TTATGTCTATTTAAAGCCTCATATTTAAAGACAGGGGAGAGCAGAACGGAGCCCCAGGCCCTCTGTGTCCCTTCCCTGCATTTCTGAGTTTTCATTCTCCTGCC				
TGTAGCAGTGAGAAAAGCTCCTGTCTCTCCCATCCCCCTGGACTGGGAGGTAGATAGGTAAATACCAAGTATTTTATTACTATGACTGCTCCCCCAGCCCTGG				2200
CTCTGCAATGGGCACTGGGATGAGCCGCTGTGAGCCCCCTGGTCCCTGAGGGTCCCCCACCCTGGGACCCTTGAGAGTATCAGGTCTCCCCACGTGGGAGACAAG				2300
AAATCCCTGTTTAATATTTAAACAGCAGTGTTCCTCCATCTGGGTCCCTTGCACCCCTCACTCTGGCCCTCAGCCGACTGCACAGCGGCCCTGCATCCCCCTT				2400
GGCTGTGAGGCCCCCTGGACAAGCAGAGGTGGCCAGAGCTGGGAGGCATGGCCCTGGGGTCCCAACGAATTTGCTGGGGAATCTCGTTTTTCTCTTAAGAC				2500
TTTTTGGGACATGGTTTGACTCCCCGAACATCACCGACGTGTCTCTCTGTTTTTCTGGGTGGCCCTCGGGACACCTGCCCTGCCCCCCCAGGAGGTGAGGACTGT				2600

T A B E L VIII (fortsat)

GACTCTTTTATAGGGCCAGGCAGGTGCCCTGGACATTTGCCTTGCTGGATGGGGACTGGGGATGTGGGAGGGAGCAGACAGGAGGAATCATGTACGGCCTGT	2700
GTGTGAAAGGAAGCTCCACTGTCAACCTCTTCACCCCCCACTCACCAAGTGTCCCCCTCCACTGTCAATTTGTAACCTGNACTTCAGGATAATAAAG	2800
TGTTTGCCCTCCAGTCACGTCCCTTCTTTGAGTCCAGCTGGTGCCCTGGCCAGGGGCTGGGGAGGTGGCTGAAAGGTGGGAGAGGCCAGAGGGAGGT	2900
CGGGAGGAGGTCTGGGGAGGAGGTCCAGGGAGGAGGAAAGTTCTCAAGTTGGTCTGACATTCATTCGTTAGCACATATTTATCTGAGCACCTACT	3000
CTGTGCAGACGCTGGGCTAAGTGTGGGGACACAGCAGGGGAACAAGGCAGACATGGAATCTGCACTCGAG	3070

Et restriktionsendonucleasekort (ca. 3,4 kb) for genomisk DNA, der indeholder hpG-CSF genet, vises i detaljer i fig. 1. Restriktionsendonucleaserne i fig. 1 er: NcoI, N; PstI, P; BamHI, B; ApaI, A; XhoI, X; og Kpn, K. Pilene under kortet viser den sekvenseringsstrategi, man benytter for at opnå den genomiske sekvens. De indrammede regioner er sådanne, som man finder i cDNA klonen og den punkterede åbne indramning repræsenterer en sekvens, der ikke findes i cDNA klonen, men er identificeret med blot med mRNA sonde. Man udførte identifikation af de kodende sekvenser, der foreslås til exon én ved Northern blot analyse. En 24 mer oligonucleotid sonde, 5'CAGCAGCTGCAGGGCCATCAGCTT³', der spændte over de antagne sammensplejsningsforbindelser for exonerne 1 og 2, blev hybridiseret med hpG-CSF mRNA i Northern blot format. Det resulterende blot viser en mRNA af samme størrelse (ca. 1650 bp), som man ser med en exon 2 oligonucleotidsonde. Dette resultat og evnen til at dirigere eksprimering af hpG-CSF ud fra pSVGM-ppol vektoren (Eksempel 9) med Met initieringskodon, vist i Tabel VIII, definerer de kodende sekvenser, der findes i exon 1. Exonerne 2-5 defineres ved de kodende sekvenser, som man opnår i cDNA klonen (Ppo2) fra hpG-CSF genet (Tabel VII).

25

Eksempel 6 (Reference)

Eksemplet angår præparering af et fremstillet gen, der koder for hpG-CSF og omfatter kodoner til E. coli.

30

I korthed anvendte man samme fremgangsmåde, som vises i PCT publikation WO83/04053, Alton, et al. Generne blev konstrueret, idet man først samlede komponent oligonucleotider til multiple duplexer, som derefter

ter blev samlet i tre adskilte sektioner. Disse sektioner blev konstrueret, så de let kunne mangfoldiggøres, og efter fjernelse fra mangfoldiggørelsessystemet kunne samles i rækkefølge eller ved en ligering af mange fragmenter til en passende eksprimeringsvektor.

Konstruktionen af sektionerne I, II og III illustreres i tabellerne IX-XIV. Ved konstruktionen af sektion I, som illustreret i Tabellerne IX og X, samlede man oligonucleotiderne 1-14 til 7 duplexer (1 og 8; 2 og 9; 3 og 10; 4 og 11; 5 og 12; 6 og 13; og 7 og 14). Man sammenbandt derefter de syv duplexer under dannelse af sektion I som vist i Tabel X. Man bør notere i forbindelse med Tabel X, at sektion I indeholder opstrøms en XbaI klæbende ende og nedstrøms en BamHI klæbende ende, der er nyttig til sammenbinding med mangfoldiggørelses- og eksprimeringsvektorer og til ligering til sektion II.

T A B E L IX

5

EChpG-CSFDNA SECTION I

10

15

20

CTAGAAAAACCAAGGAGGTAATAAA	1
TAATGACTCCATTAGTCCTGCTTCTTCT	2
CTGCCGCAAAGCTTTCTGCTGAAATGTCTGG	3
AACAGGTTCGTAAAATCCAGGGTGACGGT	4
GCTGCACTGCAAGAAAACTGTGCGCTA	5
CTTACAAACTGTGCCATCCGGAAGAGC	6
TGGTACTGCTGGGTCATTCTCTTGG	7
CATTATTTATTACCTCCTTGGTTTTTT	8
GCAGAGAAGAAGCAGGACCTAATGGAGT	9
TGTTCCAGACATTTACAGCAGAAAGCTTTGCG	10
CAGCACCGTCACCCTGGATTTTACGAACC	11
TAAGTAGCGCACAGTTTTTCTTGCAAGT	12
ACCAGCTCTTCCGGATGGCACAGTTTG	13
GATCCCAAGAGAATGACCCAGCAGT	14

EChpG-CSFDNA SECTION I

XbaI

[illegible]

130 5 140 150 160 6 170 180
 CACTGCAAGA A⁵AACTGTGC GCTACTTACA AACTGTGCCA TCCGGAAGAG CTGGTACTGC
 GTGACGTTCT TTTTGACACG CGATGAATGT TTGACACGGT AGGCCTTCTG GACCATGACG
 12 13

7 190 100
TGGGTCATTC TCTGG
ACCCAGTAAG AGAACCCCTAG
14

BamHI

Som illustreret som i Tabellerne XI og XII i forbindelse med konstruktion af sektion II samlede man oligonucleotiderne 15-20 i 8 duplexer (15 og 23; 16 og 24; 17 og 25; 18 og 26; 19 og 27; 20 og 28; 21 og 29; 5 og 22 og 30). Derefter sammenbandt man disse 8 duplexer til opnåelse af sektion II, som vist i Tabel XII. Som yderligere vist i Tabel XII besidder sektion II opstrøms en BamHI klæbende ende og nedstrøms en EcoRI klæbende ende, der er nyttig til ligering til en mangfoldiggørelsesvektor og til ligering til sektion I. Tæt ved nedstrømsenden omfatter sektion II også et nedstrøms SstI sted, der er nyttig ved eventuel sammenbinding af sektionerne II og III.

15

T A B E L X I

EChpG-CSFDNA SECTION II

20

GATCCCGTGGGCTCCGCTGTCTTCT 15

TGTCCATCTCAAGCTCTTCAGCTGGC 16

TGGTTGTCTGTCTCAACTGCATTCTGGT 17

CTGTTCTGTATCAGGGTCTTCTG 18

CAAGCTCTGGAAGGTATCTCTCCGGA 19

25

ACTGGGTCCGACTCTGGACACTCTGCA 20

GCTAGATGTAGCTGACTTTGCTACTACT 21

ATTTGGCAACAGATGGAAGAGCTCAAAG 22

GACAAGAAGACAGCGGAGCCCCACGG 23

ACCAGCCAGCTGAAGAGCTTGAGATG 24

30

ACAGACCAGAATGCAGTTGAGACAGACA 25

CTTGCAGAAGACCCTGATACAGGA 26

CAGTTCCGGAGAGATACCTTCCAGAG 27

TAGCTGCAGAGTGTCAGAGTCGGACC 28

AAATAGTAGTAGCAAAGTCAGCTACATC 29

AATTCTTTGAGCTCTTCCATCTGTTGCC 30

T A B E L XII

EChpG-CSFDNA SECTION II

10	15	20	30	40	50	60
GATCCCGTG	GGCTCCGCTG	TCTTCTTGTC	CATCTCAAGC	TCTTCAGCTG	GCTGGTTGTC	
GGCAC	CCGAGGCGAC	AGAAGAACAG	GTAGAGTTTC	AGAAGTCGAC	CGACCAACAG	
	<u>23</u>			<u>24</u>		
<u>BamHI</u>						
70	80	90	100	110	120	
TGTCTCAACT	GCAATCTGGT	CTGTTCTCTGT	ATCAGGGTCT	TCTGCAAGCT	CTGGAAGGTA	
ACAGAGTTGA	CGTAAGACCA	GACAAGGACA	TAGTCCCAGA	AGACGTTCCA	GACCTTCCAT	
	<u>25</u>		<u>26</u>		<u>27</u>	
130	140	150	160	170	180	
TCTCTCCGGA	ACTGGGTCCG	ACTCTGGACA	CTCTGCAGCT	AGATGTAGCT	GACTTTGCTA	
AGAGAGGCCT	TGACCCAGGC	TGAGACCTGT	GAGACGTCGA	TCTACATCGA	CTGAACACGAT	
		<u>28</u>			<u>29</u>	
190	200	210	220	230	240	
CTACTATTG	GCAACAGATG	GAAGAGCTCA	AAG			
GATGATAAAC	CGTTGTCTAC	CTTCTCGAGT	TTCTTAA			
		<u>30</u>				
		<u>SstI</u>		<u>ECORI</u>		

Endelig konstruerede man sektion III som vist i Tabellerne XIII og XIV. Med henblik på denne konstruktion samlede man oligonucleotiderne 31-42 i 6 duplexer (31 og 37; 32 og 38; 33 og 39; 34 og 40; 35 og 41; 5 og 36 og 42). Man sammenligerede derefter de 6 duplexer under dannelse af sektion III, som vist i Tabel XIV. Som også vist i Tabel XIV omfatter sektion III opstrøms en BamHI klæbende ende og nedstrøms en EcoRI klæbende ende, nyttig til ligering i en mangfoldiggørelsesvektor 10 og, i hvert fald når det drejer sig om EcoRI, i en eksprimeringsvektor. Derudover besidder sektion II et opstrøms SstI sted, nyttig ved eventuel ligering af sektionerne II og III.

15

T A B E L XIII

ECHGpG-CSFDNA sektion III

20	GATCCAAAGAGCTCGGTATGGCACCAG	31
	CTCTGCAACCGACTCAAGGTGCTATGCCG	32
	GCATTGCGCTTCTGCATTCCAGCGTCGTGC	33
	AGGAGGTGTACTGGTTGCTTCTCATCTG	34
	CAATCTTTCCTGGAAGTATCTTACCGTGT	35
25	TCTGCGTCATCTGGCTCAGCCGTAATAG	36
	AGAGCTGGTGCCATACCGAGCTCTTTG	37
	ATGCCGGCATAGCACCTTGAGTCGGTTGC	38
	TCCTGCACGACGCTGGAATGCAGAAGCGA	39
	ATTGCAGATGAGAAGCAACCAGTACACC	40
30	CAGAACACGGTAAGATACTTCCAGGAAAG	41
	AATTCTATTACGGCTGAGCCAGATGACG	42

35

T A B E L XIV

EChpG-CSFDNA SECTION III

10	31	20	30	40	32	50	60
GATCCAAAG	AGCTCGGTAT	GGCACCAGCT	CTGCAACCGA	CTCAAGGTGC	TATGCCGGCA		
GTTTC	TCGAGCCATA	CCGTGTCGA	GACGTTGGCT	GAGTTCCACG	ATACGGCCCGT		
	<u>37</u>			<u>38</u>			
<u>BamHI</u>	<u>SstI</u>						
70	33	80	90	100	34	110	120
TTCGCTTCTG	CATTCACCG	TCGTGCAGGA	GGTGACTGG	TTGCTTCTCA	TCTGCAATCT		
AAGCGAAGAC	GTAAGGTCGC	AGCAGTCCT	CCACATGACC	AACGAAGAGT	AGACGTTAGA		
	<u>39</u>			<u>40</u>			
35	130	140	150	36	160	170	
TTCCTGGAAG	TATCTTACCG	TGTTCTGCGT	CATCTGGCTC	AGCCGTAATA	G		
AAGGACCTTC	ATAGAATGGC	ACAAGACGCA	GTAGACCCGAG	TCGGCATTAT	CTTAA		
	<u>41</u>			<u>42</u>			
							<u>ECORI</u>

XbaI-BamHI fragmentet, dannet af sektion I, liggeres i en M13mpl1 phag vektor, åbnet med XbaI og BamHI. Man genåbner derefter vektoren ved fordøjelse med BamHI og EcoRI, hvorefter man liggerer med BamHI-EcoRI fragmentet, dannet af sektion II. På dette trin er sektionerne I og II blevet sammenbundet i den rigtige orientering. Derefter åbner man en anden M13mpl1 vektor ved hjælp af fordøjelse med BamHI og EcoRI og liggerer den derefter med BamHI-EcoRI fragmentet, dannet af sektion
10 III.

Man lader vektoren, der indeholder sektionerne I og II, fordøje med XbaI og SstI. Ligeledes lader man vektoren, der indeholder sektion III, fordøje med SstI og EcoRI. De mindste af de to fragmenter, der i begge
15 tilfælde dannes ved fordøjelsen, liggeres i et plasmid pCFM1156, som tidligere er åbnet med XbaI og EcoRI. Reaktionsproduktet er et eksprimeringsplasmid, der indeholder en kontinuert DNA sekvens, som vist i Tabel XV, og som koder for hele hpG-CSF polypeptidet med en amino-
20 terminal methioninkodon (ATG) til initiering af translation i E. coli.

-1- +1

C	TAG	AAA	AAA	CCA	AGG	AGG	TAA	TAA	ATA	Met	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu
10										20									
CCG	CAA	AGC	TTT	CTG	CTG	AAA	TGT	CTG	GAA	CAG	GTT	CGT	AAA	ATC	CAG	GGT	GAC	GGT	GCT
Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Cys	Leu	Glu	Gln	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala
30										40									
Ala	Leu	Gln	Glu	Lys	Leu	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Leu
GCA	CTG	CAA	GAA	AAA	CTG	TGC	GCT	ACT	TAC	AAA	CTG	TGC	CAT	CCG	GAA	GAG	CTG	GTA	CTG
50										60									
Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	ala	Pro	Leu	Ser	Ser	Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu
CTG	GGT	CAT	TCT	CTT	GGG	ATC	CCG	TGG	GCT	CCG	CTG	TCT	TCT	TGT	CCA	TCT	CAA	GCT	CTT
70										80									
Gln	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ser	Gln	leu	His	Ser	Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu
CAG	CTG	GCT	GCT	TGT	CTG	TCT	CAA	CTG	CAT	TCT	TCT	GGT	CTG	TTC	CTG	TAT	CAG	GGT	CTT
90										100									
Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp
CAA	GCT	CTG	GAA	GGT	ATC	TCT	CCG	GAA	CTG	GGT	CCG	ACT	CTG	GAC	ACT	CTG	CAG	CTA	GAT
110										120									
Val	Ala	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	leu	Gly	Met	Ala	Pro	Ala
GTA	GCT	GAC	TTT	GCT	ACT	ACT	ATT	TGG	CAA	CAG	ATG	GAA	GAG	GAG	CTC	GGT	ATG	GCA	CCA
130										140									
Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala	Phe	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly
CTG	CAA	CCG	ACT	CAA	GGT	GCT	ATG	CCG	GCA	TTC	GCT	TCT	GCA	TTC	CAG	CGT	CGT	GCA	GGA

T A B E L XV (fortsat)

[illegible]

Selv om man kan anvende en hvilken som helst passende vektor til at eksprimere dette DNA, kan man uden videre konstruere eksprimeringsplasmidet pCFM1156 ud fra et plasmid pCFM836, hvis konstruktion er beskrevet i EPO
5 publiceret patentansøgning nr. 136 490. Man gennemskærer først pCFM836 med NdeI og afrunder enderne med PolI, således at begge de eksisterende NdeI steder ødelægges. Derefter lader man vektoren fordøje med ClaI og SacII, så man fjerner en eksisterende polysammenbinder før lig-
10 ering til en substitut polysammenbinder, som illustreret i Tabel XVI. Man kan konstruerer denne substitut polysammenbinder ved fremgangsmåden ifølge Alton, et al., se ovenfor. Kontrol af eksprimeringen i eksprimeringsplasmidet pCFM1156 foregår ved hjælp af en lambda P_L promo-
15 tor, som selv måske er under kontrol af et Cl857 represor gen (såsom hvad der tilvejebringes i E. coli stamme K12ΔHtrp).

T A B E L XVI

1 ATCGATTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACCGCGTTGGAAATTCGGTACCAT
TAGCTAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGCCCATGGTA

1 Clal, 12 XbaI, 29 NdeI, 35 HincII, HpaI, 39 MluI, 47 EcoRI,
53 HgiCI KpnI, 57 NcoI StyI,

61 GGAAGCTTACTCGAGGATCCGCGGATAAATAAGTAACGATCC
CCTTCGAATGAGCTCCTAGGCGCCTATTATTTCATTGCTAGG

63 HindIII, 70 AvaI XhoI, 75 BamHI Xho2, 79 Sac2,

Eksempel 7 (Reference)

Dette Eksempel angår E. coli eksprimering af et hpG-CSF polypeptid ved hjælp af en DNA sekvens, der koder for [Met⁻¹]hpCSF. Den anvendte sekvens var delvis syntetisk og delvis afledt fra cDNA. Den syntetiske
5 sekvens benyttede kodoner egnet til E. coli.

Man fordøjede plasmidet Ppo2, der indeholdt hpG-CSF genet vist i Tabel VII, med HgiAI og StuI under tilvejebringelse af et ca. 645 basepar fragment, der indeholdt genet for færdig hpCSF (som vist i Tabel VII) med
10 syv af ledersekvensens kodoner i 5' enden og ca. 100 basepar i den ikke kodende 3'-ende. Fordøjelse med HgiAI tilvejebringer en 5' 4-base klæbende ende, der er identisk med, hvad man får med PstI, og fordøjelse med StuI giver en lige ende. Dette medfører, at man uden videre
15 kan indsætte fragmentet i M13 mp8 (Rf) gennemskåret med PstI, og med det ligeende-dannende restriktionsenzym HincII. Efter mangedobling i M13 lod man hpG-CSF DNA udskære ved fordøjelse med ApaI og BamHI, som henholdsvis skærer ved ApaI stedet, der indeholder kodonerne for
20 resterne +3 til +5 i hpCSF og ved et BamHI sted "nedstrøms" i forhold til HincII stedet i M13 mp8 restriktionssammenbinderen. For at man kunne opnå E. coli eksprimering af hpG-CSF polypeptidet, fremstillede man et syntetisk fragment, som vist i Tabel XVII nedenfor.

T A B E L XVII

5' - C TAG AAA AAA CCA AGG AGG TAA TAA ATA
 3' - TTT TTT GGT TCC TCC ATT ATT TAT
XbaI

-1 +1
 Met Thr Pro Leu
 ATG ACA CCT CTG GGC C - 5'
 TAC TGT GGA GAC -3'
ApaI

10

Som man kan se ved analyse af Tabel XVII, omfatter sammenbinderen en ApaI klæbende ende, kodoner, der koder for de første tre rester i aminoenden af hpG-CSF (og som "genopretter" kodonerne, der koder for Thr¹, Pro² og Leu³, og som blev udslettet ved ApaI fordøjelse af M13 DNA, beskrevet ovenfor, og under anvendelse af kodoner, der fortrinsvis eksprimeres i E. coli), et translationsinitierende ATG, en sekvens på 24 basepar, der tilvejebringer et ribosombindingssted og en XbaI klæbende ende.

Eksprimeringsvektoren, som man anvender til E. coli eksprimering, var den, der beskrives som pCFM536 i EPO patentansøgning nr. 136 490, Morris, offentliggjort 10. april 1985. (Se også A.T.C.C. 39934, E. coli JM103 med indhold af pCFM536). Kort fortalt fordøjede man plasmid pCFM536 med XbaI og BamHI. Man ligerede derefter hpG-CSF fragmentet (ApaI/BamHI) og sammenbinderen (XbaI/ ApaI), beskrevet ovenfor, under dannelse af et plasmid, der blev betegnet p536Ppo2.

Man transformerede plasmid p536Ppo2 i en phag modstandsdygtig variant af E. coli AM7 stammen, som tidligere var blevet transformeret med plasmidet pMW1

(A.T.C.C. nr. 39933), der indeholdt et Cr^{857} gen. Man kontrollerede transformationen ved hjælp af markørgenet for antibiotisk modstand (amp), som bæres af stamfaderplasmidet pCFM536. Cellekulturer i LB urt (ampicillin 5 50 μg i 1 ml) blev opretholdt ved 28°C, og efter vækst af celler i kulturen til $A_{600} = 0,5$, inducerede man hpCSF eksprimering, idet man forhøjede temperaturen af kulturen til 42°C i tre timer. Den sluttelige O.D. af kulturen var $A_{600} = 1,2$.

10 Man bestemte niveauet for eksprimering af hpG-CSF af de transformerede celler på en SDS-polyacrylamidgel, farvet med blå coomassifarve til at være 3-5% af total cellulær protein.

Man indhøstede celler ved centrifugering ved 3500 15 g i 10 minutter på en JS-4,2 rotor. Man knuste celler i vand 25% (w/v), idet man lod opslæmningen passere tre gange gennem en French trykcelle ved 10.000 psi. Den sønderdelte cellesuspension blev centrifugeret ved 10.000 g i 15 minutter i en JA-20 rotor. Bundfaldet 20 blev igen suspenderet i vand og solubiliseret med et indhold på ca. 5 mg/ml total protein i 1% laurinsyre, 50 mM Tris, pH 8,7. Det solubiliserede materiale fra bundfaldet blev centrifugeret ved 15.000 g i ti minutter, og man satte CuSO_4 op til en koncentration på 20 mM til supernatanten. Efter en time påsatte man denne prøve en 25 C4 HPLC søjle til rensning ifølge fremgangsmåden i Eksempel 1 (B) med korrektioner for rumfang og koncentration.

Man udviklede en anden rensningsfremgangsmåde med 30 henblik på større mængder af hpG-CSF formuleret i en puffer, der indeholdt ikke-organisk materiale. Dette materiale er egnet til in vivo studier. Man udsuspenderede 150 g cellepasta i ca. 600 ml 1 mM DTT og lod det

fire gange passere gennem en Manton Gualin homogenisator ved ca. 7000 psi. Den knuste cellesuspension blev centrifugeret ved 10.000 g i 30 minutter, og man udsuspenderede bundfaldet i 400 ml desoxycholat (DOC), 5 mM EDTA, 5 mM DTT, og 50 mM Tris, pH 9. Denne suspension blev sammenblandet i 30 minutter ved stuetemperatur og centrifugeret ved 10.000 g i 30 minutter. Man udsuspenderede igen bundfaldet i ca. 400 ml vand og centrifugerede ved 10.000 g i 30 minutter. Bundfaldet blev solubiliseret i 100 ml 2% sarkosyl og 50 mM ved pH 8. Man tilsatte CuSO_4 op til 20 μM og holdt blandingen under omrøring 16 timer ved stuetemperatur, hvorefter man centrifugerede ved 20.000 g i 30 minutter. Til supernatant tilsatte man 300 ml acetone. Denne blanding blev anbragt på is i 20 minutter og derefter centrifugeret ved 5000 g i 30 minutter. Bundfaldet blev opløst i 250 ml 6 M guanidin og 40 mM natriumacetat ved pH 4 og påsat en 1200 ml G-25 søjle, bragt i ligevægt og drevet med 20 mM natriumacetat ved pH 5,4. Fraktioner med indhold af hpG-CSF (ca. 400 ml) blev sammenbragt og påsat en 15 ml CM-cellulosesøjle, bragt i ligevægt med 20 mM natriumacetat ved pH 5,4. Efter påsætningen vaskede man søjlen med 60 ml 20 mM natriumacetat ved pH 5,4 og med 25 mM natriumchlorid og derefter eluerede man søjlen med 200 ml 20 mM natriumacetat ved pH 5,4 og med 37 mM natriumchlorid. 150 ml af dette gennemløb blev indkoncentreret til 10 ml og påsat en 300 ml G-75 søjle, bragt i ligevægt og drevet med 20 mM natriumacetat og 100 mM natriumchlorid ved pH 5,4. Fraktioner med relevant indhold (35 ml) blev sammenbragt og filtersteriliseret. Slutkoncentrationen af hpG-CSF var 1,5 mg/ml, det var mere end 95% rent som bestemt ved analyse på en gel og indeholdt mindre end 0,5 ng pyrogen pr. 0,5 mg hpG-CSF.

Indholdet af pyrogen blev bestemt under anvendelse af et Limulus Amebocyte Lysate (LAL) prøveudstyr (M. A. Bio-products, Walkersville, Maryland).

5 Eksempel 8

I dette Eksempel benyttede man et pattedyrscelle-eksprimeringsystem til at fastslå, om et aktivt polypeptidprodukt ud fra phG-CSF DNA kunne eksprimeres i og udskilles af pattedyrsceller (COS-1, A.T.C.C. CRL-1650).
10 Systemet blev konstrueret, så det kunne tilvejebringe udskillelse af et polypeptid analogt til phGCSF ved eksprimering og udskillelse af en delvis syntetisk, delvis cDNA-afledt konstruktion, der kodede for [Ala¹] hpG-CSF, hvor der foran var anbragt et leader polypeptid med en
15 sekvens af aminosyrerester, som henføres til human G-CSF ifølge Wong, et al., Science, 228, 810-815 (1985) og Lee, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82, 4360-4364 (1985).

Eksprimeringsvektoren, som man anvendte til fore-
20 løbige studier af eksprimering af polypeptidprodukter ifølge opfindelsen, var en "shuttle"-vektor, der inkorporerede både pBR322 og SV40 DNA, og som var blevet konstrueret til autonom replikation både i E. coli og i pattedyrsceller, idet eksprimeringen i pattedyrsceller
25 af indsat exogen DNA var under kontrol af en viral promotor/regulator DNA sekvens. Denne vektor, betegnet pSVDM-19 i E. coli Hn 101, blev deponeret 23. august 1985 hos American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, med nr. A.T.C.C.
30 53241.

Ved konstruktion af ekspressionsvektoren udførte man følgende specifikke manipulationer. Man syntetiserede en DNA sekvens, der kodede for leader, som nævnt i

aktuelle værtscelle at fjerne GM-CSF leaderpeptidet ved cellemekanismer, normalt forbundet med udskillelse af GM-CSF.

Man fordøjede plasmid pSVDM-19 med KpnI og udfyldte til lige ender med Klenow enzym. Derefter gennemskar man DNA med HindIII. Det resulterende store fragment blev kombineret og ligeret med HindIII/PvuII fragmentet, der er vist i Tabel VII (isoleret fra plasmid Ppo2 som det næststørste fragment efter en HindIII fordøjelse og en delvis fordøjelse med PvuII) under dannelse af plasmid pSV-Ppol. Derefter ligerede man det fremstillede GM-CSF leadersekvensfragment i Tabel VIII i pSV-Ppol (efter at det var kløvet med HindIII og ApaI) til opnåelse af plasmid pSVGM-Ppol.

Man transformerede calciumphosphatprecipitater (1-5 µg) af plasmid pSVGM-Pol DNA i duplikat 60 mm plader af COS-1 celler, i det væsentlige som beskrevet ifølge Wigler, et al., Cell, 14, 725-731 (1978). Som kontrol transformerede man også plasmid pSVDM-19 i COS-1 celler. Man indhøstede supernatanten over vævskulturen fem dage efter transficering og analyseredes for hpG-CSF aktivitet. Udbyttet af [Ala¹]hpG-CSF fra kultursupernatanten var af størrelsesordenen 1 - 2,5 µg/ml.

Efter den positive eksprimering af plasmidet pSVGM-Ppol, der koder for [Ala¹]hpG-CSF i COS-1 celler, konstruerede man en anden vektor, som omfattede den humane GM-CSF leadersekvens, men havde en kodon for en threoninrest (naturlig forekommende i position 1 i hpG-CSF), der erstattede kodonet for alanin ved denne stilling. I korthed syntetiserede man et oligonucleotid (5' CAGCATCTCTACACCTCTGGG) til positionsrettet mutagenese (SDM). Man ligerede HindIII - BamHI hpG-CSF fragmentet i pSVGM-Ppol i M13mp10 med henblik på SDM. Det nysyn-

tetiserede hpG-CSF gen, der indeholdt en Thr kodon i position 1, blev isoleret ved spaltning med HindIII og EcoRI. Derefter klonede man fragmentet i pSVDM-19, forberedt ved kløvning med de samme to restriktions-
 5 endonucleaser. Den resulterende vektor pSVG-M-Ppo(Thr) blev transformeret i COS celler, og udbyttet af hpG-CSF målt i supernatanten fra kulturen lå i området 1-5 µg/ml.

Endelig anvendte man den genomiske sekvens, hvis
 10 isolering beskrives i Eksempel 5, til at danne en ekspressionsvektor til eksprimering hpG-CSF i pattedyrsceller. Mere detaljeret lod man pSVDM-19 fordøje med KpnI og HindIII og benyttede det store fragment i en firedobbelte legering med en syntetisk sammenbinder med HindIII
 15 og NcoI klæbende ender, som vist i Tabel XXI. Et NcoI - BamHI fragment, der indeholdt exon 1 isoleret fra pBR322 (8500 hpG-CSF), en genomisk subklon, og et BamHI - KpnI fragment med indhold af exonerne 2-5, isoleret fra plasmid pBR322 (8599 hpG-CSF genomisk subklon). Den resul-
 20 terende ekspressionsvektor til pattedyrsceller, pSV/ghG-CSF producerede 1-2,5 µg/ml hpG-CSF fra transformerende COS celler.

T A B E L XXI

25

HindIII
 5' AGCTTCCAACAC
 AGGTTGTGGTAC 5'
 NcoI

30

Eksempel 9

Eksemplet angår fysiske og biologiske egenskaber af rekombinante polypeptidprodukter beslægtet med et sådant ifølge opfindelsen.

5

1. Molekylvægt

Rekombinante hpG-CSF produkter fra E. coli eksprimering som i Eksempel 7 havde en tilsyneladende molekylvægt på 18,8 kD, bestemt ved hjælp af reducerende SDS-PAGE (som man ville vente ud fra de angivne aminosyrer i Tabel VII), hvorimod naturlige isolater renses som i Eksempel 1 har en tilsyneladende molekylvægt på 19,6 kD. En teori om tilstedeværelse af N-glycaner, associeret med de naturlige isolater, kan afvises, da der mangler asparaginrester i primærsekvensen for hpG-CSF i Tabel VII, og som følge heraf konstruerede man en fremgangsmåde til at bestemme, om O-glycaner var ansvarlige for forskelle i molekylvægt mellem de naturlige isolater og de ikke-glycosylerede rekombinante produkter. Man behandlede ca. 5 µg af naturligt isolat med neuraminidase (Calbiochem, LaJolla, Californien), man udtog en prøve på 0,5 µg og inkuberede resten med 4 mU O-glycanase (endo-x-n-acetylgalactoseaminidase, Genzyme, Boston, Massachusetts) ved 37°C. Man udtog lige store portioner efter ½, 2 og 4 timers inkuberung. Disse prøver blev underkastet SDS-PAGE side om side med det rekombinante materiale, afledt fra E. coli. Efter behandling med neuraminidase ændredes den tilsyneladende molekylvægt af isolatet fra 19,6 kD til 19,2 kD, hvad der kunne skyldes, at en "sialic acid" rest blev fjernet. Efter to timers behandling med O-glycanase ændredes molekylvægten til 18,8 kD - denne værdi er identisk med den tilsyneladende molekylvægt af materialet, afledt fra E. coli. På

grund af carbohydratstrukturens følsomhed overfor neuraminidaser og O-glycanase, kan man foreslå følgende struktur for carbohydratkomponenten: N-acetyl-neuraminsyre- α (2-6)(galactose β (1-3) N-acetylgalactose-amin-R, hvori R er serin eller threonin.

2. Optagelse af ^3H -Thymidin

Man undersøgte induktion af vækst ved celledeling for humane knoglemarvsceller, baseret på voksende inkorporering af ^3H -thymidin. Man underkastede human knoglemarv fra sunde donorer en opdeling med hensyn til densitet ved hjælp af Ficoll-Hypaque (1,077 g/ml, Pharmacia) og udsuspenderede celler med lav densitet i Iscove's medium (GIBCO), der indeholdt 10% kalvefoster-serum og glutamin pen-strep. Derefter inkuberede man 2×10^4 humane knoglemarvsceller med enten kontrolmedium eller det rekombinante E. coli materiale fra Eksempel 7 i plader med 96 fordybninger med flad bund ved 37°C , med 5% CO_2 i luften i to dage. Man foretog dobbeltanalyser og lod koncentrationen variere med en faktor 10.000. Kulturerne blev derefter holdt under pulsering i fire timer med $0,5 \mu\text{Ci}$ /fordybning ^3H -thymidin (New England Nuclear, Boston, Massachusetts). Man målte optagelsen af ^3H -thymidin som beskrevet hos Ventua, et al., Blood, 61, 781 (1983). Ved dette forsøg kan humane hpG-CSF isolater inducere inkorporering af ^3H -thymidin i humane knoglemarvsceller i et ca. 4-10 gange højere niveau end ved anvendelse af kontrolsupernatanter. hpG-CSF materialet, afledt fra E. coli, ifølge Eksempel 6, havde lignende egenskaber.

Man udførte et andet studie over vækst ved celledeling af humane knoglemarvsceller, idet man anvendte et dyrkningsmedium fra transficerede COS-1 celler ifølge

Eksempel 9, og opnåede samme resultater, hvad der var et tegn på, at det kodede polypeptidprodukt faktisk som aktivt materiale blev udskilt i dyrkningsmediet.

5 3. Inducering af differentiering i WEHI-3B D⁺

Evnen hos rekombinant materiale afledt fra E. coli, til at inducere differentiering i den myelomonocytiske leukæmicellelinie WEHI-3B D⁺ fra mus, blev undersøgt i et halvfast agarmedium, som beskrevet i Metcalf, 10 Int. J. Cancer, 25, 255 (1980). Man inkuberede det rekombinante hpG-CSF produkt og et kontrolmedium med ca. 60 WEHI-3B D⁺ celler/fordybning ved 37°C med 5% CO₂ i luften i syv dage. Man inkuberede prøverne i plader med 24 fordybninger med flad bund og lod koncentrationen variere med en faktor 2000. Kolonierne blev opdelt som 15 ikke-differentierede, delvis differentierede eller fuldstændig differentierede, og man talte celler i kolonierne under mikroskop. Man fandt, at det rekombinante materiale fra E. coli inducerede differentiering.

20

4. Analyser for CFU-GM, BFU-E og CFU-GEMM

Man fandt, at naturlige isolater af pluripotent human G-CSF (hpG-CSF) og det rekombinante pluripotente human G-CSF (rhpG-CSF) kunne få menneskelige knoglemarvsceller til at undergå celledeling og differentieres. Disse aktiviteter blev målt ved CFU-GM [Broxmeyer, 25 et al., Exp. Hematol., 5, 87, (1971)] BFU-E og CFU-GEMM assays [Lu, et al., Blood, 61, 250 (1983)] under anvendelse af ikke-sammenhængende knoglemarvsceller med lav 30 densitet fra sunde frivillige mennesker. En sammenligning af CFU-GM, BFU-E og CFU-GEMM biologiske aktiviteter under anvendelse af enten 500 enheder hpG-CSF eller rhpG-CSF vises i Tabel XXII nedenfor.

Alle koloniforsøgene blev udført med ikke-sammenhængende knoglemarvsceller med lav densitet. Man underkastede humane knoglemarvsceller en densitetopdeling med Ficoll-Hypaque (densitet $1,077 \text{ g/cm}^3$; Pharmacia). Man udsuspenderede cellerne med lav densitet i Iscove's modificerede Dulbecco's medium, der indeholdt kalvefoster-serum og anbragte dem på Falcon vævskulturskåle (nr. 3003, Becton Dickenson, Cockeysville, MD.) i $1\frac{1}{2}$ time ved 37°C .

10

T A B E L XXII (Reference)

	CFU-GM	BFU-E	CFR-GEMM
15 Kontrolmedium	0 ± 0	26 ± 1	0 ± 0
Naturligt hpG-CSF	$83 \pm 5,4$	$83 \pm 6,7$	4 ± 0
rhpg-CSF	87 ± 5	$81 \pm 0,1$	6 ± 2

Kontrolmediet bestod af Iscove's modificeret Dulbecco medium plus 10% FCS, 0,2 mM hæmin og 1 enhed rekombinant erythropoietin.

Ved et CFU-GM assay udplattede man de pågældende celler i et antal på 1×10^5 i 1 ml 0,3% agar dyrkningsmedium, der omfattede suppleret McCoy's 5A medium og 10% varmeinaktiveret kalvefoster-serum. Man gennemsøgte kulturerne for kolonier (mere end 40 celler pr. sammenklumpning) og undersøgte morfologien den syvende kulturdag. Antallet af kolonier vises som middelværdi $\pm$ standardafvigelse, bestemt ud fra firedobbelte forsøg.

30

Ved BFU-E og CFU-GEMM assays satte man celler (1×10^5) til en 1 ml blanding af Iscove's modificeret Dulbecco medium (Gibco), 0,8% methylcellulose, 30% kalve-

fosterserum, 0,05 mM 2-mercaptoethanol, 0,2 mM hemin og 1 enhed rekombinant erythropoietin. Man inkuberede skålene i en fugtig atmosfære, der indeholdt 5% CO₂ og 5% O₂. Man opnåede et lavt oxygentryk ved hjælp af en oxyreducer fra Reming Bioinstruments (Syracuse, N.Y.). Man talte kolonier efter 14 dages inkubering. Antallet af kolonier vises som middelværdi ± standardafvigelse, bestemt ved dobbeltforsøg.

Man fandt, at alle kolonier, der blev dannet i CFU-GM assayet, var positive overfor chloracetatesterase og negative overfor ikke specifik esterase (α-naphthylacetatesterase), i overensstemmelse med, at kolonierne er af granulocyttype. Man fandt, at både naturlig hpG-CSF og rhpG-CSF havde en specifik aktivitet på ca. 1×10^8 U/mg rent protein, når det blev undersøgt ved voksende fortynding i et CFU-GM assay. BFU-E og CFU-GEMM data i Tabel XXII er repræsentative for tre adskilte eksperimenter, og resultaterne ligner data, man tidligere har opgivet for naturlig hpG-CSF. Det er vigtigt at bemærke sig, at rhpG-CSF er overordentlig ren og fri for andre mulige vækstfaktorer fra pattedyr på grund af sin frembringelse i E. coli. rhpG-CSF er således i stand til at understøtte dannelse af blandede kolonier (CFU-GEMM), og BFU-E når det tilsættes under tilstedeværelse af rekombinant erythropoietin.

5. Forsøg med cellebinding

Det er tidligere blevet meddelt, at WEHI-3B(D⁺) celler og humane leukæmiceller fra frisk diagnosticeret leukæmi vil binde ¹²⁵I-mærket G-CSF fra mus, og at der kan foregå konkurrence om denne binding ved tilsætning af ikke-mærket G-CSF eller human CSF-β. Man afprøvede evnen hos naturlig hpG-CSF og rhpG-CSF til at konkurrere

om binding af ^{125}I -hpG-CSF til leukæmiceller fra mennesker og mus. Man ioderede højrenset naturlig hpG-CSF (>95% ren, 1 μg) [Trejedor, et al., Anal. Biochem., 127, 143 (1982)], og man skilte det fra reaktanterne ved
5 hjælp af gelfiltrering og ionbytterchromatografi. Den specifikke aktivitet af det naturlige ^{125}I -hpG-CSF var omtrent $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ protein. Man afprøvede WEHI-3B(D^+) fra mus og to præparationer af periferae myeloide leukæmiceller fra menneskeblod (ANLL, én klassificeret som
10 M4, en anden som M5B) for deres evne til at binde ^{125}I -hpG-CSF.

Museleukæmicellerne og de frisk indsamlede humane periferale myeloide leukæmiceller fra blod blev vasket tre gange med PBS/1% BSA. Man inkuberede WEHI-3B(D^+)
15 celler (5×10^6) eller friske leukæmiceller (3×10^6) i dobbeltforsøg i PBS/1% BSA (100 μl) under fravær eller nærvær af forskellige koncentrationer (rumfang: 10 μl) ikke mærket hpG-CSF, rhpG-CSF eller GM-CSF og under tilstedeværelse af ^{125}I -hpG-CSF (ca. 100.000 cpm eller 1
20 ng) ved 0°C , i 90 minutter. (Totalrumfang; 120 μl). Man udsuspenderede cellerne igen og anbragte dem som et lag over 200 μl iskold FCS i 350 μl plastcentrifugerør og centrifugerede dem (1000 g, 1 min.). Man indsamlede bundfaldet ved at skære enden af røret af og talte bund-
25 faldet og supernatanten hver for sig i en gammataeller (Packard).

Man bestemte specifik binding (cpm) som totalbinding under fravær af en konkurrent (gennemsnit af to forsøg) minus bindungen (cpm) under tilstedeværelse af
30 et 100 dobbelt overskud af ikke-mærket hpG-CSF (ikke specifik binding). Den ikke-specifikke binding var maksimal 2503 cpm for WEHI-3B(D^+) celler, 1072 cpm for ANLL (M4) celler og 1125 cpm for ANLL (M5B) celler. Det før-

ste og det andet eksperiment blev udført på adskilte dage med samme præparation af ^{125}I -hpG-CSF, og forsøgene udviser indre konsistens med henseende til procentværdien af inhibition, opnået for 2000 enheder hpG-CSF. Data 5 angives i Tabel XXIII nedenfor.

T A B E L XXIII

Konkurrent	(U/ml)	WEHI-3B(D ⁺)		ANLL (M4)		ANLL (M5B)	
		cpm	% inhib.	cpm	% inhib.	cpm	% inhib.
<u>Eks. 1</u>							
Ingen	0	6.608	-	1.218	-	122	-
naturlig							
hpG-CSF:	100.000	685	90				
	2.000	1.692	74	34	97	-376	0
	200	2.031	69				
63							
<u>Eks. 2</u>							
Ingen	0	2.910	0				
Naturlig							
hpG-CSF:	2.000	628	78	202	83	0	0
GM-CSF:	2.000	3.311	0				

Som angivet i Tabel XXIII udviste ^{125}I -hpG-CSF binding til WEHI-3B(D⁺) leukæmicellerne. Bindingen blev dosisafhængigt inhiberet af umærket naturligt hpG-CSF eller rhpG-CSF, men ikke af GM-CSF. Derudover observerede man binding af naturligt hpG-CSF til humane myelomonocytiske leukæmiceller (ANLL, M4). Bindingen til disse celler har en parallel i væskeformige kulturers respons til naturlig hpG-CSF, idet de differentierer til fuldt udviklet macrophager, bedømt ud fra morfologien.

10 Den manglende binding af naturlig ^{125}I -hpG-CSF til monocytiske leukæmiceller fra en anden patient (ANLL, M5B) kan skyldes, at visse leukæmiceller kan differentiere på en anden måde eller mangle receptorer for hpG-CSF. Evnen af rhpG-CSF til at konkurrere med naturlig hpG-CSF om

15 binding til naturlig ^{125}I -hpG-CSF er et tegn på, at receptorerne genkender begge former i lige høj grad.

Disse forsøg, der demonstrerer bindingen af naturlig ^{125}I -mærket hpG-CSF til leukæmiceller, har en parallel i evnen hos naturlig hpG-CSF til at inducere

20 granulocytisk og monocytisk differentiering af knoglemarvsceller med lav densitet, opnået fra en patient med akut promyelocytisk leukæmi (M3) og en anden patient med akut myeloblastisk leukæmi (M2). Celler fra de to patienter blev dyrket i fire dage enten i dyrkningsmedium

25 alene eller under tilstedeværelse af 1×10^5 enheder rhpG-CSF. Celler fra M3 kontrolmediet inkuberet alene her var stadig af promyelocyt-type; hvorimod celler, dyrket under tilstedeværelse af rhpG-CSF udviste fuldt udviklede celler af den myeloide type, deriblandt en

30 metamyelocyt, en kæmpe båndform og segmenteret neutrophilis og monocyt. For denne patient var opdelingen af 100 celler i kontrolgruppen 100% promyelocyter, og af rhpG-CSF behandlede celler 22% blastceller plus promye-

locyter, 7% myelocyter, 35% metamyelocyter, 20% båndformer plus segmenterede neutrofile, 14% monocytter og 2% macrophager. En interessant kendsgerning er, at en af de polymorphonucleære granulocyter stadig indeholdt et 5 dominerende auerlegeme, et tegn på, at i det mindste denne celle repræsenterede en differentieret celle, der hørte til leukæmiklonen. Celler fra den anden patient med myeloblastisk leukæmi (M2) blev også dyrket fire dage under fravær eller tilstedeværelse af rhpG-CSF.

10 Ved gennemsyn af M2 celler, der var dyrket i mediet alene, kunne man iagttage store "blastagtige" celler, af hvilke nogle besad kerner. Visse af M2 cellerne differentierede, når de blev behandlet med rhpG-CSF, til fuldt udviklede segmenterede neutrophile med rest af auerlegemer i centret af neutrophilen, et tegn på at der 15 var foregået differentiering i en celle, der tilhørte leukæmiklonen. En opdeling af 100 celler, der var undersøgt morphologisk, viste, at cellerne fra kontrolgruppen bestod af 100% blastceller. De celler, der var 20 behandlet med rhpG-CSF, bestod af 43% blastceller, 1% myelocyter, 15% metamyelocyter, 28% båndformer plus segmenterede neutrophile, 2% promonocyter og 11% monocytter. Man undersøgte også leukæmicellerne med henblik på differentiering ved fire andre koncentrationer af 25 rhpG-CSF (5×10^3 , 1×10^4 , $2,5 \times 10^4$ og 5×10^4 U/ml, data ikke vist). Selv ved de lavest afprøvede koncentrationer af rhpG-CSF (5×10^3 U/ml) var der tydelig differentiering (cellerne differentierede længere end til myelocyter) af M3 (50%) og M2 (37%) leukæmicel-

30 lerne.

6. Immunassay

Til fremstilling af polyklone antistoffer til brug i immunassay anvendte man som antigen pluripotent G-CSF, oprenset fra human blærecarcinom cellelinie 5637 (1A6), som fremstillet i Eksempel 1 (B). På basis af sølvnitratfarvning af polyacrylamidgeler vurderede man materialet til at være 85% rent. Man immuniserede seks uger gamle Balb/C mus med mange subkutane injektioner af antigenet. Antigenet blev udsuspenderet i PBS og emulgeret med lige så store rumfang af Freund's komplette adjuvans.

Dosis var 5-7 µg antigen pr. mus pr. injektion. 18 dage senere forstærkede man immuniseringen ved den samme mængde antigen emulgeret med et lige så stort rumfang af Freund's ikke-komplette adjuvans. 4 dage senere udtog man musedserum til afprøvning for indhold af det antistof, der var specifikt overfor human pluripotent G-CSF.

Man overtrak Dynatech Immulon II Removawell strips i holdere (Dynateck Lab., Inc., Alexandria, Virginia) med hpG-CSF 5 µg/ml i 50 mM carbonat-bicarbonat-puffer, pH 9,2. Fordybninger i plader blev overtrukket med 0,25 µg i et rumfang på 50 µl. Man inkuberede de antigendækkede plader to timer ved stuetemperatur natten over ved 4°C. Man fradekanterede opløsningen og inkuberede pladerne 30 minutter med PBS med indhold af 5% BSA for at blokere den reaktive overflade. Man fradekanterede denne opløsning og tilsatte enten fortyndet pre-immunserum eller serum til afprøvning til fordybningerne og inkuberede to timer ved stuetemperatur. Sera blev fortyndet med PBS, pH 7,0, med indhold af 1% BSA. Man fradekanterede serumopløsningen og vaskede pladerne tre gange med Wash Solution (KPL, Gaithersburg, Maryland).

67.

Tilsatte ca. 200.000 cpm ioderet kanin-antimus IgG (NEN, Boston, Massachusetts) i 50 µl PBS, pH 7,0, med indhold af 1% BSA til hver fordybning. Efter inkubering 1½ time ved stuetemperatur fradekanterede man denne opløs-
5 ning og vaskede pladerne fem gange med Wash solution. Man fjernede fordybningerne fra holderen og talte dem i en Beckman 5500 gamma tæller. Højaktiv museserum viste mere end 12 gange større reaktivitet end det tilsvarende præ-immune serum ved en fortynding på 1:100.

10 Man bestemte de immunologiske egenskaber af E. coli-afledt hpG-CSF ved reaktivitet over for højaktiv museserum, der var specifikt overfor pattedyrscelle afledt hpG-CSF. Man overtrak Immulon II Removawells med 0,25 µg 90% ren E. coli afledt protein i et rumfang på
15 50 µl og analyserede museserummet som beskrevet ovenfor.

Højaktive musesera udviste en 24 gange højere reaktivitet overfor materiale fra E. coli end de tilsvarende præ-immune sera ved en fortynding på 1:100.

20

7. In vivo bioassay

Man forbandt Alzet osmotiske pumper (Alzet Corp., Palo Alto, CA; Model 2001) til permanente katetere i den
25 højre halsåre og implanterede dem under huden på syv syriske guldhamstre. Fire af pumperne indeholdt en puffer [20 mM natriumacetat (pH 5,4) og 37 mM natriumchlorid] og 1,5 mg/ml E. coli-afledt hpG-CSF, hvorimod 3 kun indeholdt puffer. Pumpehastigheden var angivet til at
30 være 1 µl/time i op til syv dage. Tre dage efter anbringelsen af pumperne var middelantallet af granulocytter hos de fire behandlede hamstere seks gange højere end hos de tre kontrolhamstere (puffer), og samtidig med

det forøgede antal af granulocytter var der en firedobling i antallet af totale lymfocytter. Antallet af erythrocyter blev ikke ændret ved behandlingen. Disse resultater er et tegn på, at det rekombinante materiale
5 producerer en specifik forstærkning af produktionen af og/eller frigivelse af granulocytter hos et pattedyr.

Den opfinderiske DNA-sekvens, som koder for en hpG-CSF polypeptidanalogue, kan være nyttig i henseende til den information, den leverer om aminosyresekvensen
10 fra pattedyrsproteinet, som tidligere har været utilgængeligt, trods analyseforsøg på isolater af naturligt forekommende produkter. DNA sekvensen ifølge opfindelsen kan være egnet materiale til anvendelse som mærkede sonder ved isolering af hpG-CSF og beslægtet protein, der
15 kodes af human genomisk DNA, såvel som cDNA og genomiske DNA sekvenser fra andre pattedyrsarter. DNA sekvensen kan også være nyttig ved forskellige andre fremgangsmåder for proteinsyntese (f.eks. i insektceller) eller i genetisk terapi på mennesker og andre pattedyr. Man
20 venter, at DNA sekvenser ifølge opfindelsen er nyttige ved udvikling af transgene pattedyrs-specier, som kan tjene som eukaryotiske "værter" ved produktion af hpG-CSF og hpG-CSF produkter i store mængder. Se i denne forbindelse Palmiter, et al., Science, 222 (4625),
25 809-814 (1983).

Med relevans til polypeptidanalogen ifølge opfindelsen kan nævnes rapporter om den immunologiske aktivitet af syntetiske peptider, som i det væsentlige duplikerer aminosyresekvenser, der findes i naturligt forekommende proteiner, glycoproteiner og nucleoproteiner.
30 Mere detaljeret har man vist, at relativt lavmolekylære polypeptider indgår i immunreaktioner, som med henseende til varighed og udbredelse ligner immunreaktionerne af

fysiologisk signifikante proteiner som virale antigener, polypeptidhormoner og lignende. Blandt immunreaktionerne på sådanne polypeptider er inkluderet provokation af dannelse af specifikke antistoffer i immunologisk aktive

5 dyr. Se f.eks. Lerner, et al., Cell, 23, 309-310 (1981); Ross, et al., Nature, 294, 654-656 (1981); Walter, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 77, 5197-5200 (1980); Lerner, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78, 3403-3407 (1981); Walter, et al., Proc.

10 Natl. Acad. Sci. (USA), 78, 4882-4886 (1981); Wong, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 78, 7412-7416 (1981); Green, et al., Cell, 28, 477-487 (1982); Nigg, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 79, 5322-5326 (1982); Baron, et al., Cell, 28, 395-404 (1982);

15 Dreesman, et al., Nature, 295, 185-160 (1982); og Lerner, et al., Scientific American, 248, nr. 2, 66-74 (1983). Se også Kaiser, et al., Science, 223, 249-255 (1984) hvad angår biologiske og immunologiske aktiviteter af syntetiske peptider, som med tilnærmelse deler

20 den sekundære struktur med peptidhormoner, men muligvis ikke har primær strukturel konformation tilfælles med dem.

P A T E N T K R A V

1. DNA-sekvens, der ved eksprimering i en prokaryotisk eller eukaryotisk værtscelle koder for et polypeptidprodukt, der besidder i det mindste en del
5 af den primære struktur og en eller flere af de biologiske egenskaber for naturligt forekommende pluripotent granulocyt kolonistimulerende faktor (hpG-CSF), hvor DNA-sekvensen er k e n d e t e g n e t ved at kode for [Ala¹]hpG-CSF.
- 10 2. cDNA sekvens ifølge krav 1.
3. Genomisk DNA-sekvens ifølge krav 1.
4. DNA-sekvens ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at den er kovalent associeret med en påviselig markørsubstans, især en radioaktiv markør.
- 15 5. Enkeltstrenget DNA-sekvens ifølge krav 4.
6. Biologisk funktionelt plasmid eller viral DNA-vektor, k e n d e t e g n e t ved, at det inkluderer en DNA-sekvens ifølge krav 1.
7. Prokaryotisk eller eukaryotisk værtscelle,
20 k e n d e t e g n e t ved, at den er transformeret eller transficeret med en DNA-sekvens ifølge krav 1 på en sådan måde, at værtscellen kan eksprimere polypeptidproduktet [Ala¹]hpG-CSF.
8. Prokaryotisk eller eukaryotisk værtscelle,
25 k e n d e t e g n e t ved, at den er stabilt transformeret eller transficeret med en DNA-vektor ifølge krav 6.
9. Værtscelle ifølge krav 7 eller 8, k e n d e t e g n e t ved, at værten er en pattedyrscelle.

10. Fremgangsmåde til fremstilling af polypeptidet [Ala¹]hpG-CSF, k e n d e t e g n e t ved, at man under egnede næringsbetingelser dyrker prokaryotiske eller især eukaryotiske værtsceller, der er 5 transformeret eller transficeret med en DNA-sekvens ifølge krav 1 på en sådan måde, at de kan eksprimere det nævnte polypeptid, og at man isolerer det ønskede polypeptid fra ekspressionen af DNA-sekvensen.

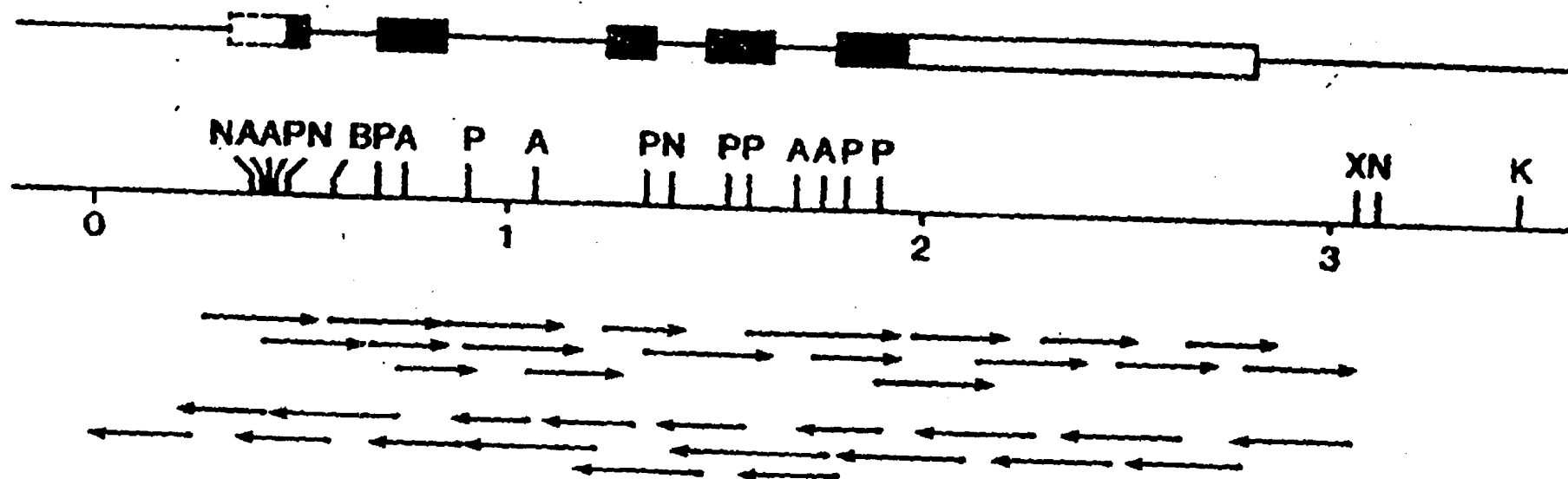
11. [Ala¹]hpG-CSF som ikke naturligt forekom- 10 mende polypeptid, k e n d e t e g n e t ved, at det er produkt af ekspression i en prokaryotisk eller især eukaryotisk værtscelle af en DNA-sekvens ifølge krav 1.

12. Farmaceutisk præparat, k e n d e t e g - 15 n e t ved, at det omfatter en effektiv mængde af polypeptidet ifølge krav 11 og/eller fremstillet ifølge krav 10, og et farmaceutisk acceptabelt fortyndingsmiddel, adjuvans eller bærer.

13. Farmaceutisk præparat ifølge krav 12, yder- 20 ligere k e n d e t e g n e t ved at være frit for association med noget som helst humant protein.

14. Anvendelse af polypeptidet ifølge krav 11 til fremstilling af et lægemiddel til tilvejebringelse af hæmatopoietisk terapi på et pattedyr.

FIG.1



RESTRIKTIONSENDONUCLEASEKORT (delvis) OVER hpG-CSF-GENET