(19) DANMARK

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT (11) 165750 B

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 2262/83

(22) Indleveringsdag: 20 maj 1983

(41) Alm. tilgængelig: 21 nov 1983

(44) Fremlagt: 11 jan 1993

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 20 maj 1982 JP 86180/82

(51) Int.Cl.5 C 07 K 15/26
C 07 K 13/00
C 12 N 15/23
C 12 N 15/70

(71) Ansøger: *SUNTORY LTD.; 1-40, Dojimahama 2-chome; Kita-ku; Osaka, JP

(72) Opfinder: Shoji *Tanaka; JP, Takehiro *Oshima; JP, Hiroshi *Nakasato; JP, Teruhisa *Noguchi; JP

(74) Fuldmægtig: Firmaet Chas. Hude

(54) Fremgangsmåde til fremstilling af humant gamma-interferonlignende polypeptid, polydeoxyribonucleotid, der koder for polypeptidet, plasmid indeholdende polydeoxyribonucleotidet samt en vært for dette plasmid

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 4602/82, 1321/83

(57) Sammendrag: 2262-83

Humant gamma-interferonlignende polypeptid fremstilles ved at dyrke værtsceller såsom Escherichia coli transformeret med et syntetisk polydeoxyribonucleotid. Polypeptidets humane gamma-interferon-aktivitet bekræftes ved en test under anvendelse af et anti-humant interferon-antistof.

DK 165750 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til fremstilling af et humant gamma-interferonlignende polypeptid (i det følgende forkortet til γ-IFN), polydeoxyribonucleotid, der koder for polypeptidet, plasmid indeholdende polydeoxyribonucleotidet samt en vært for dette plasmid.

Det kemisk syntetiserede DNA-molekyle, som omhandles heri, er ejendommeligt ved, at DNA-sekvensen, som koder for et polypeptid, stemmer i alt væsentligt overens med hensyn til aminosyresekvensen og sammensætningen med humant gamma-interferon og har humant gamma-interferons immunologiske eller biologiske virkning.

Interferon omfatter tre klasser, nemlig alpha, beta og gamma, af proteiner, som angives at være i stand til at fremkalde en antiviral tilstand, eller som også udviser antitumorvirkning.

Det er kendt, at γ-IFN kan fremstilles ved gensplejsningsteknikken under anvendelse af et gen fremstillet ved omvendt transskription af en messenger RNA i nærværelse af en omvendt transskriptase (Nature, 295, 503, 1982). Denne teknik er imidlertid ufordelagtig, bl.a. ved, at det på grund af, at gensekvensen defineres af messenger RNA, er umuligt at vælge codoner, der er passende for værtsceller.

Kemisk syntese af γ-IFN-genet kan sandsynligvis løse den ovennævnte ulempe og kan også føre til opbygningen af et chimerisk polypeptid ved additionen af arbitrære restriktionsenzymspaltningssteder. Syntesen af nævnte gen er imidlertid ikke let, da det er sammensat af flere hundrede basepar.

De pågældende opfindere bestræbte sig på at løse denne vanskelighed, og det lykkedes dem at syntetisere et γ-IFN-gen. De udviklede således en fremgangsmåde til fremstilling af

γ-IFN ved gensplejsningsteknikken under anvendelse af nævnte gen.

Den foreliggende opfindelse angår således en fremgangsmåde til fremstilling af humant gamma-interferon-lignende polypeptid, som er ejendommelig ved dyrkning i et næringsmedium af værtsceller transformeret med et plasmid med et polydeoxyribonucleotid, som har en translations-initieringskode ved 5'-enden, efterfulgt af en nucleotidsekvens, som består af

```
 1                                   10
TGC TAC TGC CAG GAC CCA TAC GTG AAG GAA GCT GAA AAC CTG AAG
ACG ATG ACG GTC CTG GGT ATG CAC TTC CTT CGA CTT TTG GAC TTC

                  20                                    30
AAA TAC TTC AAC GCT GGT CAT TCT GAC GTT GCT GAC AAC GGT ACT
TTT ATG AAG TTG CGA CCA GTA AGA CTG CAA CGA CTG TTG CCA TGA

                                    40
CTG TTC CTG GGT ATC CTG AAA AAC TGG AAA GAA GAA TCT GAC CGT
GAC AAG GAC CCA TAG GAC TTT TTG ACC TTT CTT CTT AGA CTG GCA

                  50                                    60
AAA ATC ATG CAG TCT CAG ATC GTT TCT TTC TAC TTC AAG CTG TTC
TTT TAG TAC GTC AGA GTC TAG CAA AGA AAG ATG AAG TTC GAC AAG

                                    70
AAA AAC TTC AAG GAC GAC CAG TCT ATC CAG AAA TCT GTT GAA ACT
TTT TTG AAG TTC CTG CTG GTC AGA TAG GTC TTT AGA CAA CTT TGA

                  80                                    90
ATC AAG GAA GAC ATG AAC GTT AAG TTC TTC AAC TCT AAC AAG AAA
TAG TTC CTT CTG TAC TTG CAA TTC AAG AAG TTG AGA TTG TTC TTT

                                   100
AAG CGT GAC GAC TTC GAA AAG CTT ACT AAC TAC TCT GTT ACT GAC
TTC GCA CTG CTG AAG CTT TTC GAA TGA TTG ATG AGA CAA TGA CTG
```

```
                  110                                             120
CTT AAT GTA CAG CGT AAA GCT ATC CAT GAA CTG ATC CAG GTT ATG
GAA TTA CAT GTC GCA TTT CGA TAG GTA CTT GAC TAG GTC CAA TAC

                                      130
GCT GAA CTG TCC CCG GCT GCT AAA ACT GGT AAG CGT AAA AGA TCT
CGA CTT GAC AGG GGC CGA CGA TTT TGA CCA TTC GCA TTT TCT AGA

                  140                         146
CAG ATG CTG TTC CGT GGT CGT CGT GCT TCT CAG
GTC TAC GAC AAG GCA CCA GCA GCA CGA AGA GTC,
```

hvori TGC / ACG kan være erstattet med TGT / ACA,

der koder for aminosyresekvensen

```
          1                                            10
      Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
                                  20
  Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val
              30
  Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn
      40                                          50
  Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
                                      60
  Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys
              70
  Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys
      80                                          90
  Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys
                                 100
  Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val
                  110
  Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu
          120
  Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr
  130                                         140
  Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg

  Arg Ala Ser Gln,
```

og en efterfølgende nucleotidsekvens, der koder for translationens afslutning, indført deri, og derved forårsager dannelse af polypeptidet med den ovennævnte aminosyresekvens som en proteinkomponent i kultursuppen. Opfindelsen angår endvidere

det ovennævnte polydeoxyribonucleotid, det ovennævnte plasmid, en Escherichia coli-stamme transformeret med nævnte plasmid og fremgangsmåder til fremstilling deraf.

På tegningerne er hensigten med figurerne 1 - 5 og figurerne 8 - 11 at supplere beskrivelsen af eksemplet. Sekvensen af hver af 62 oligodeoxyribonucleotider anvendt til syntesen af et syntetisk γ-IFN-gen, fig. 1-(2), viser aminosyresekvensen af humant γ-IFN, og nucleotidsekvensen af γ-IFN-genet, fig. 2 og 3 belyser oligodeoxyribonucleotid-syntheseprocessen, fig. 4 viser oligodeoxyribonucleotid-ligationsskemaet, fig. 5 belyser skemaet for bestemmelse af basesekvensen af det syntetiserede γ-IFN-gen, og fig. 8 viser fremgangsmåden til konstruktion af plasmid pGIF. Fig. 9 er 14% polyacrylamidgel-elektroforese-kortlægningen for polydeoxyribonucleotidblokkene A, B, C, D, E og F syntetiseret og for molekylvægtsmærkeren M (HinfI digest med ϕ x 174RF), fig. 10 er 8% polyacrylamidgel-elektroforese-kortlægningen for hver af blokprodukterne [I] og [II] af ligation ifølge det i fig. 4 viste skema og for molekylvægtsmærkeren M (HpaII digest med ϕ x 174RF), og fig. 11 er 6% polyacrylamidgel-elektroforese-kortlægningen for hver af de ovennævnte blokke [I] og [II], det syntetiske γ-IFN og molekylvægtsmærkeren M (HpaII digest af pBR322 DNA). Fig. 6 er restriktionsenzym-spaltningskortet for det syntetiske γ-IFN-gen, og fig. 7 er restriktionsenzym-spaltningskortet for plasmidet pKO703, idet de numeriske værdier i parenteserne repræsenterer afstanden i antal af basepar fra EcoRI-genkendelsesstedet. Fig. 12 er en grafisk illustration af molekylvægten af hver fraktion opnået ved gelfiltrering af den overliggende væske, som igen blev opnået ved centrifugering af frarevne Escherichia coli-celler, som udviste inteferonvirkning.

Et foretrukket eksempel på det ovennævnte polydeoxyribo=nucleotid er ét, som har en sekvens, der koder for aminosyresekvensen 1-146, som vist i fig. 1-(2) og med en trans-

lations-initieringskode såsom ATG ved 5'-enden og en translations-termineringskode såsom TAA ved 3'-enden.

Fordi ATG binder (cords) methionin, omfatter γ-IFN ifølge den foreliggende opfindelse naturligvis et peptid tilsat med formyl-methionin eller methionin ved 5'-enden af ovennævnte aminosyresekvens 1-142, således som det er vist i fig. 1-(2).

For nemheds skyld i forbindelse med genmanipulation foretrækkes det at tilsætte en nucleotidsekvens, som kan spaltes med et restriktionsenzym til hver af de translationsinitierende og translations-terminerende kodeafslutninger. Ved en foretrukket udførelsesform sættes en EcoRI-spaltelig nucleotidsekvens til 5'-enden og en SalI-spaltelig nucleotidsekvens til 3'-enden.

Det ovennævnte polydeoxyribonucleotid kan syntetiseres f.eks. på følgende måde. Først syntetiseres de 62 genfraktioner (oligodeoxyribonucleotider), der er vist i fig. 1-(1), ved hjælp af den i og for sig kendte modificerede phosphortriestermetode og fastfasemetode. Derpå konstrueres et komplet γ-IFN-gen [jfr. fig. 1-(2)] ved ligation af disse fragmenter under anvendelse af T4 DNA - ligase. Dette syntetiske gen indeholder restriktionsenzymspaltningssteder, som vist i fig. 6. Dette er med henblik på at lette eftersøgningen efter aktive grundstrukturer (site structures) eller konstruktion af chimeriske gener.

På det næste sted indføres det ovennævnte gen i et vektorplasmid. I det følgende findes et eksempel på indføringsmetoden.

Først konstrueres et plasmid, pKO703, ved at indsætte promotorregionen (99 basepar) af Escherichia coli-lactoseoperonen mellem EcoRI-og SalI-spaltningsstederne af pBR322. Derpå konstrueres et plasmid, pGIF, ved at indføre det syn-

tetiske gen, som vist i fig. 1-(2), som har et EcoRI-spaltningssted på 5'-endesiden og et SalI-spaltningssted på 3'-endesiden, mellem EcoRI- og SalI-spaltningsstederne af plasmidet pKO703 (jfr. fig. 8).

Om ønsket kan der konstrueres et plasmid med et andet gen end γ-IFN-genet, der er indført mellem de ovenfor nævnte spaltningssteder. Dyrkning af værtsceller transformeret med det ovenfor nævnte plasmid kan fordelagtigt bevirke dannelse af et produkt af nævnte gen under kontrol af lactosepromotoren.

Som værtsceller kan der anvendes bakterier, gær og andre svampe såvel som dyrkede humane og andre animalske celler og dyrkede planteceller.

Bakterierne er f.eks. af slægterne Escherichia, Bacillus eller Pseudomonas. Mere specielle eksempler er Escherichia coli, Bacillus subtilis, Bacillus stearothermophilus, Pseudomonas putida og Pseudomonas aeruginosa.

Gærarterne er f.eks. de som hører til slægten Saccharomyces.

Saccharomyces cerevisiae er et foretrukket eksempel.

En stamme, som hører til slægten Escherichia, transformeres med det på ovennævnte måde opnåede plasmid pGIF. Når Escherichia coli WA802 anvendes som nævnte stamme, opnås der en transformant-stamme, der benævnes WA802/pGIF. Denne stamme er ampicillin-resistent (Amp^r) og tetracyklin-følsom (Tet^s), hvorfor den kan isoleres fra non-transformanter.

Ved induktiv dyrkning af ovennævnte transformantstamme i et medium, såsom L-suppe, under anvendelse af isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid dannes et stof med interferonvirkning i cellerne.

Stammen Escherichia coli WA802/pGIF4 har fået kodenavnet SBMG105 og er blevet deponeret ved Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, under deponeringsnummer FERM BP 282.

En fremgangsmåde til udøvelse af den foreliggende opfindelse er beskrevet nedenfor ved hjælp af et eksempel. Escherichia coli betegnes undertiden som E.coli.

EKSEMPEL:

Kemisk syntese af γ-IFN-genfragment.

Den kemiske syntese af 62 oligodeoxyribonucleotider, henholdsvis betegnet F_1 - F_{62} i fig. 1-(1), blev, bortset fra de i det følgende nævnte forbedringer, gennemført i alt væsentligt ved hjælp af den af Ken-ichi Miyoshi et al.

[Nucl.Acids Res., 8, 5507 (1980)] beskrevne fastfase-metode.

Enkelthederne vedrørende den kemiske syntese af disse oligodeoxyribonucleotider ved hjælp af den forbedrede teknologi er som følger:

a) Først blev, som vist i fig. 2, 3'-ende-mononucleosid-enheden bundet til en aminomethyleret polystyrenharpiks. Således er den i fig. 2 viste aminomethylerede polystyrenharpiks (1) en harpiks, der er tværbundet med 1% divinylbenzen, og harpiksen (2) blev fremstillet ved at sætte to enheder af β-alanin til (1). Derpå blev tre forskellige forbindelser (3) (B repræsenterer thymin, N-benzoylcytosin eller N-isobutyrylguanin) omsat med den ovennævnte harpiks (2) til dannelse af tre forskellige polystyrenharpikser (4), hver med 3'-ende-nucleosidet.

Det følgende er et eksempel på syntese af den samme harpiks (4) relevant for N-isobutyrylguanin for B i fig. 2.

20 g aminomethyleret polystyren,HCl (divinylbenzen 1%, 100-200 mesh, NH_2:0,63 mmol/g) blev opkvældet omhyggeligt med 100 ml CH_2Cl_2,og N-t-BOC-β-alanin (1,34 g, 15,1 mmol) blev tilsat. Kondensationsreaktionen blev gennemført i nærværelse af DCC (3,11 g, 15,1 mmol) ved stuetemperatur i 3 timer. Harpiksen blev filtreret gennem et glasfilter og vasket to gange med 200 ml portioner af CH_2Cl_2, tre gange med 150 ml portioner af DMF og til slut tre gange med 100 ml portioner af pyridin. Harpiksen blev derpå behandlet med 100 ml 25% eddikesyreanhydrid-pyridin i 1 time for at acetylere de uomsatte aminogrupper. Harpiksen blev derpå behandlet med 120 ml 20% CF_3COOH-CH_2Cl_2 ved stuetemperatur i 30 minutter for at eliminere t-BOC-grupperne. Harpiksen blev vasket med 200 ml 5% triethylamin-CH_2Cl_2 og yderligere vasket fire gange med 100 ml portioner af CH_2Cl_2. Den ovennævnte fremgangsmåde blev gentaget endnu en gang for at opnå harpiksen (2) fra fig. 2, d.v.s. den aminomethylerede polystyrenharpiks med to β-alanin-enheder. I 60 ml DMF blev der suspenderet 10 g af den ovennævnte harpiks [fig. 2 (2)], efterfulgt af tilsætning af 11 mmol af forbindelse (3) [fig. 2 (3)] (hvor B betegner N-isobutyrylguanin) og 1 ml triethylamin. Blandingen blev omrystet ved stuetemperatur i 12 timer. Efter reaktionen blev harpiksen skilt fra ved filtrering, vasket med DMF og derpå med pyridin og til slut behandlet med 150 ml 10% phenylisocyanat-pyridin i 3 timer til beskyttelse af de uomsatte aminogrupper. Harpiksen blev derpå vasket med pyridin-methanol og tørret under reduceret tryk i nærværelse af P_2O_5, hvorved harpiksen (4) fra fig. 2 (B betegner N-isobutyrylguanin) blev opnået.

Under anvendelse af en portion af denne harpiks [fig. 2 (4), hvor B er N-isobutyrylguanin] blev den mængde 3'-endenucleosid, som er fastgjort til 1 g af harpiksen, bestemt ved undersøgelse af metoden ifølge M.J.Gait et al. [Nucl.Acids

Res., 8, 1081 (1980)]. Resultatet var 0,12 mmol. Harpiksen (4), hvori B er thymin eller N-benzoylcytosin, blev også fremstillet på den samme måde som beskrevet ovenfor. Mængden af 3'-ende-nucleosid fastgjort til 1 g harpiks (4) var 0,126 mmol for B=thymin og 0,125 mmol for B=N-benzoylcytosin.

b) Under anvendelse af disse tre typer af harpiks (4) og 3'-phosphorsyrediesterdimerblokken (fig. 3, n=0) og 3'-phosphorsyrediestertrimerblokken (fig. 3, n=1) har 62 oligodeoxyribonucleotider F_1 - F_{62} de specificerede forudbestemte basesekvenser. Harpiksen (4) blev således behandlet med 10% trichloreddikesyre (forkortet: TCA), $-CHCl_3$ til fjernelse af dimethoxytrytylgruppen (forkortet: DMTr) og derpå 4 ækvivalenter af 3'-phosphorsyrediesterdimer (fig. 3, n=0),eller 3 ækvivalenter 3'-phosphorsyrediestertrimer (fig. 3, n= 1) pr. ækvivalent af 3'-nucleosid-enheden, der er fastgjort til harpiks (5), blev fortløbende kondenseret ved hjælp af 20 - 50 ækvivalenter mesithylensulfonyltetrazolid (MsTe). Overskydende 3'-phosphorsyrediesterblok og kondensationsmiddel kunne let fjernes ved at filtrere reaktionsblandingen gennem et glasfilter.

Til beskyttelse af den uomsatte 5'-hydroxygruppe blev harpiksen derpå enten behandlet med 10% eddikesyreanhydrid-pyridin ved stuetemperatur i 1 time eller behandlet med en blanding af 10 ml 10% eddikesyreanhydrid og 20 mg 4-dimethylaminopyridin (DMAP) ved stuetemperatur i 30 minutter, hvorved de uomsatte 5'-hydroxygrupper blev acetyleret. Harpiksen blev derpå behandlet med 10% TCA til fjernelse af 5'-ende-DMTr-gruppen,og derpå blev den næste kondensationsreaktion gennemført.

Ovennævnte fremgangsmåde blev gentaget, indtil den ønskede længde var opnået.

En eksempelvis synteserække er anført nedenfor under henvisning til F_{16}-fragmentet.

200 mg harpiks (4) [fig. 2 (4), B=N-isobutyrylguanin] blev behandlet tre gange med 20 ml 10% TCA-$CHCl_3$ i 30 sekunder hver for at få harpiksen (5) uden DMTr. Til denne harpiks (5) blev der sat 96 µmol af 3'-phosphorsyredimerblokken CA (fig. 3, n=0, B_1=benzoylcytosin, B_3=N-benzoyladenin), og den azeotropiske destillation med 3 ml pyridin blev gentaget tre gange. Harpiksen blev derpå suspenderet i 2 ml pyridin, og kondensationsreaktionen blev udført under anvendelse af 1 mmol af kondensationsmidlet MsTe ved stuetemperatur i 2 timer. Efter reaktionen kunne overskud af 3'-phosphorsyredimer og kondensationsmiddel let fjernes ved at filtrere reaktionsblandingen gennem et glasfilter og vaske harpiksen omhyggeligt med pyridin. Til beskyttelse af de uomsatte 5'-hydroxygrupper blev harpiksen derpå suspenderet i 20 ml 10% eddikesyreanhydrid-pyridin, og suspensionen blev omrystet ved stuetemperatur i 1 time. Efter denne reaktion blev harpiksen skilt fra ved filtrering gennem et glasfilter og vasket omhyggeligt med pyridin og $CHCl_3$ i den nævnte rækkefølge. Harpiksen blev derpå behandlet tre gange med 20 ml 10% TCA-$CHCl_3$ i 30 sekunder hver, hvorved DMTr-gruppen blev fjernet fra harpiksen. Harpiksen blev vasket omhyggeligt med $CHCl_3$ og pyridin i nævnte rækkefølge. Den ovennævnte fremgangsmåde blev gentaget, indtil den krævede længde var opnået. Til at syntetisere oligodeoxyribonucleotidet af F_{16} blev således de næste 3'-phosphorsyredimerblokke CC, TA, GA og TC anvendt i rækkefølge. Ved disse trinvise kondensationsreaktioner blev der opnået en fuldstændigt beskyttet oligodeoxyribonucleotid-harpiks med F_{16}'s basesekvens. De andre fragmenter, F_1 - F_{15} og F_{17} - F_{62}, blev også fremstillet på den samme måde, bortset fra, at der blev anvendt forskellige kombinationer af nucleotider.

c) Adskillelsen af det fuldstændigt beskyttede oligodeoxyribonucleotid med en sådan bestemt basesekvens fra harpiksen og den fuldstændige deprotektionering deraf blev gennemført ved at behandle harpiksen med koncentreret vandig ammoniak-pyridin (2:1, volumen/volumen) ved 55°C i 10 timer og derpå med 80% eddikesyre ved stuetemperatur i 10 mi-

nutter (proces A).

Fragmenterne F_2, F_3, F_5, F_7 - F_{10}, F_{22} - F_{24}, F_{26}, F_{29}, F_{30}, F_{33} - F_{42}, F_{53} - F_{55} og F_{57} - F_{62} kunne imidlertid ikke opnås under de ovennævnte deprotektioneringsbetingelser. Disse fragmenter blev derfor fuldstændigt deprotektioneret ved hjælp af Reese et al.'s fremgangsmåde[Nucl.Acids Res., 9, 4611 (1980)] (proces B).

Denne deprotektioneringsmetode er beskrevet nedenfor under henvisning til F_{16}- og F_{26}-fragmenter.

Proces A:

I et lukket rør blev 50 mg af F_{16}-harpiksen omrystet med 1 ml pyridin og 2 ml koncentreret vandig ammoniak ved 55°C i 10 timer, og efter dette tidsrum blev harpiksen filtreret fra og filtratet koncentreret under reduceret tryk. Resten blev sat til toluen, og den azeotropiske destillation blev gentaget for at fjerne pyridinet. Resten blev behandlet med 2 ml 80% eddikesyre ved stuetemperatur i 10 minutter, hvorved der blev opnået et fuldstændigt deprotektioneret oligodeoxyribonucleotid.

Proces B:

50 mg af F_{26}-harpiksen blev behandlet med en opløsning (0,3 M) af 1,1,4,4-tetramethylguanidinium-2-pyridinaldoximat i 3,5 ml dioxan-vand (7:1, volumen/volumen) ved 40°C i 48 timer og blev derefter i et lukket rør yderligere behandlet med 3 ml koncentreret vandig ammoniak-pyridin (2:1, volumen/volumen) ved 55°C i 10 timer. Derefter blev F_{26}-harpiksen behandlet med 2 ml 80% eddikesyre ved stue-

temperatur i 20 minutter til opnåelse af fuldstændigt deprotektioneret oligodeoxyribonucleotid.

d) Isoleringen og rensningen af slutproduktet blev gennemført ved hjælp af højtydende væskekromatografi (forkortet: HPLC). Der blev således anvendt ALTEX, model 110A Liquid Chromatograph, en lineær gradientmetode under anvendelse af opløsningsmiddel A (20% CH_3CN-1 m MKH_2PO_4, pH 6,5) og opløsningsmiddel B (20% CH_3CN-500 mM KH_2PO_4, pH 6,5), og en Partisil 10 SAX (Whatman) -søjle (4,6 dia. x 250 mm). Gradienten blev etableret ved at tilsætte 3% opløsningsmiddel B til opløsningsmiddel A med 1 minuts mellemrum. Eluering blev gennemført ved 58°C og en strømningshastighed på 2 ml/min. Fraktionerne, som indeholdt den ønskede forbindelse, blev opsamlet, afsaltet ved dialyse og lyofiliseret. Homogeniteten af de 62 fuldstændigt deprotektionerede oligodeoxyribonucleotider F_1 - F_{62}, der således blev opnået, blev bekræftet ved at mærke deres 5'-ender med [gamma-^{32}P]ATP under anvendelse af T_4 polynucleotid-kinase og gennemføre polyacrylamidgel (20%) -elektroforese.

Basesekvensen af hvert oligodeoxyribonucleotid blev bekræftet ved hjælp af den todimensionale kortlægningsmetode [Bambare,J.E. et al. (1974), Nucl.Acids Res., 1, 331]. 5'-enden blev således mærket med [gamma-^{32}P]ATP under anvendelse af T_4 polynucleotid-kinase, og derefter blev partiel hydrolyse gennemført med nuclease. Dette partielle hydrolysat blev underkastet celluloseacetat-elektroforese (pH 3,5) og DEAE-cellulose-homokromatografi.

Ligation af gamma-IFN-genfragmenter:

Under anvendelse af de på ovennævnte måde syntetiserede 62 oligodeoxyribonucleotidfragmenter (1 - 62) blev genet

(fig. 1 - 2) svarende til γ-IFN bestående af 450 basepar afsnøret i overensstemmelse med det i fig. 4 viste ligationsskema. Enkeltheder vedrørende fremgangsmåden er anført nedenfor.

Blokkene [A] - [F] blev syntetiseret. Med undtagelse af 5'-endefragmenterne af hver blok (1, 14, 15, 24, 25, 32, 33, 44, 45, 54, 55, 62) blev 1 n mol af hver af de resterende 50 fragmenter opløst i 22 µl destilleret vand, og opløsningen blev opvarmet til 90°C i 2 minutter og derpå straks afkølet til 0°C. Til denne vandige opløsning blev der sat 5 µl Ci af [gamma-^{32}P]ATP (5100 Ci/mmol). Den blev derpå justeret til opnåelse af en 70 mM tris-HCl (pH 7,5) -10 mM $MgCl_2$-kinasepufferopløsning. Derefter blev der tilsat 3 enheder af polynucleotid-kinase til opnåelse af ialt 30 µl. Ved at gennemføre reaktionen ved 37°C i 15 minutter blev 5'-enderne mærket med ^{32}P. For at phosphorylere alle 5'-enderne blev der derpå yderligere tilsat 4 n mol ATP og 3 enheder polynucleotid-kinase, og reaktionen blev gennemført ved 37°C i 45 minutter. Reaktionen blev afsluttet ved at opvarme blandingen til 90°C i 5 minutter. 2,1 µg af hver af de ovennævnte phosphorylerede fragmenter 2 - 13 og ikke-phosphorylerede fragmenter 1 og 14 (blok A), phosphorylerede fragmenter 16 - 23 og ikke-phosphorylerede fragmenter 15 og 24 (blok B), phosphorylerede fragmenter 26 - 31 og ikke-phosphorylerede fragmenter 25 og 32 (blok C), phosphorylerede fragmenter 34 - 43 og ikke-phosphorylerede fragmenter 33 og 44 (blok D), phosphorylerede fragmenter 46 - 53 og ikke-phosphorylerede fragmenter 45 og 54 (blok E) og phosphorylerede fragmenter 56 - 61 og ikke-phosphorylerede fragmenter 55 og 62 (blok F) blev blandet henholdsvis dialyseret i et dialyserør over for destilleret vand ved 4°C i 16 timer for at fjerne de

uomsatte ATP- og kinasepufferkomponenter. Dette DNA-dialysat for hver af blokkene A - F blev koncentreret til tørhed og opløst i 14,5 µl ligasepuffer (20 mM tris-HCl, pH 7,6, 10 mM $MgCl_2$). Denne opløsning blev anbragt i et 40 µl fint glasrør,og efter lukning af begge rørets ender blev det opvarmet i et 16,5 mm testrør indeholdende 20 ml vand af 95°C i 2 minutter. Testrøret som helhed fik derpå lov til at henstå ved stuetemperatur i 2 timer for at aneale DNA-fragmentet. Det blev derpå anbragt ved 0°C. Denne DNA-opløsning blev taget ud af det fine glasrør og gjort til en ligasepuffer indeholdende 0,4 mM ATP og 10 mM DTT. Der blev derpå tilsat 30 enheder T4 DNA-ligase for at opnå et samlet volumen på 80 µl, og reaktionen fik lov til at forløbe ved 15°C i 16 timer. En del af reaktionsblandingen blev udtaget og underkastet elektroforese med 14% polyacrylamidgel indeholdende 7 M urinstof, og ligationstilstanden blev undersøgt ved hjælp af radioautografi. Det viste sig, at de største ligations-reaktionsprodukter med hensyn til størrelse stemte overens med de ønskede produkter til 6 blokke A - F. Derefter blev den samlede mængde af det ovennævnte ligationsprodukt fraktioneret ved elektroforese gennem 14% polyacrylamid-gel indeholdende 7 M urinstof. Efter at positionerne af A - F var blevet bekræftet ved hjælp af radioautografi, blev geldelene, som svarede til positionerne, udskåret og anbragt i dialyserør. Hvert rør blev fyldt med 9 mM tris-boratpuffer (pH 8,3, 0,25 mM EDTA tilsat) (elueringspuffer), og efter lukning af begge rørets ender blev elektroforese gennemført i elueringspufferen ved en konstant spænding på 200 V i 3 timer for at eluere DNA i gelen. DNA'en blev udtaget fra dialyserøret og lyofiliseret. Lyofilisatet blev opløst i 100 µl 0,3 M natriumacetat (pH 7,0), og to volumener ethanol blev tilsat. Blandingen fik lov til at

Fig.1-1

1) AATTCATGTGC
2) GGCAGTAGCACATG
3) TACTGCCAGGACCC
4) CACGTATGGGTCCT
5) ATACGTGAAGGAAG
6) TTTTCAGCTTCCTT
7) CTGAAAACCTGAAG
8) AAGTATTTCTTCAGG
9) AAATACTTCAACGCT
10) AATGACCAGCGTTG

11) GGTCATTCTGACGT
12) GTCAGCAACGTCAG
13) TGCTGAGAACGGTAC
14) GAACAGAGTACCGTT
15) TCTGTTCCTGGGT
16) TCAGGATACCCAG
17) ATCCTGAAAAACTG
18) TTCTTTCCAGTTTT
19) GAAAGAAGAATCTG
20) TTACGGTCAGATTC
21) ACCGTAAAATCATG

22) GAGACTGCATGATT
23) CAGTCTCAGATCGTT
24) AGAAAGAAACGATCT
25) TCTTTCTACTTCAAG
26) TGAACAGCTTGAAGT
27) CTGTTCAAAAACTT
28) GTCCTTGAAGTTTT
29) CAAGGACGACCAGT
30) TGGATAGACTGGTC
31) CTATCCAGAAATCT
32) TTTCAACAGATTTC

33) GTTGAAACTATCAAG
34) ATGTCTTCCTTGATAG
35) GAAGACATGAACGTT
36) AAGAACTTAACGTTC
37) AAGTTCTTCAACTCT
38) TTCTTGTTAGAGTTG
39) AACAAGAAAAAGCGT
40) AAGTCGTCACGCTTT
41) GACGACTTCGAAAAGC
42) TTAGTAAGCTTTTCG

43) TTACTAACTACTCT
44) CAGTAACAGAGTAG
45) GTTACTGACCTTAAT
46) GCTGTACATTAAGGT
47) GTACAGCGTAAAGC
48) ATGGATAGCTTTAC
49) TATCCATGAACTGAT
50) AACCTGGATCAGTTC
51) CCAGGTTATGGCTG
52) GGACAGTTCAGCCAT

53) AACTGTCCCCGGCTGC
54) CAGTTTTAGCAGCCGG
55) TAAAACTGGTAAGCGT
56) ATCTTTTACGCTTAC
57) AAAAGATCTCAGATG
58) GGAACAGCATCTGAG
59) CTGTTCCGTGGTCGT
60) AAGCACGACGACCAC
61) CGTGCTTCTCAGTAAG
62) TCGACTTACTGAG

Fig. 1-2

```
          1                                                  10                                                  20
      Met Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp
5' AATTC ATG TGC TAC TGC CAG GAC CCA TAC GTG AAG GAA GCT GAA AAC CTG AAG AAA TAC TTC AAC GCT GGT CAT TCT GAC
  3'  G TAC ACG ATG ACG GTC CTG GGT ATG CAC TTC CTT CGA CTT TTG GAC TTC TTT ATG AAG TTG CGA CCA GTA AGA CTG

                    30                                                  40
Val Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln
GTT GCT GAC AAC GGT ACT CTG TTC CTG GGT ATC CTG AAA AAC TGG AAA GAA GAA TCT GAC CGT AAA ATC ATG CAG
CAA CGA CTG TTG CCA TGA GAC AAG GAC CCA TAG GAC TTT TTG ACC TTT CTT CTT AGA CTG GCA TTT TAG TAC GTC

50                                                  60                                                  70
Ser Gln Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu
TCT CAG ATC GTT TCT TTC TAC TTC AAG CTG TTC AAA AAC TTC AAG GAC GAC CAG TCT ATC CAG AAA TCT GTT GAA
AGA GTC TAG CAA AGA AAG ATG AAG TTC GAC AAG TTT TTG AAG TTC CTG CTG GTC AGA TAG GTC TTT AGA CAA CTT

                    80                                                  90
Thr Ile Lys Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr
ACT ATC AAG GAA GAC ATG AAC GTT AAG TTC TTC AAC TCT AAC AAG AAA AAG CGT GAC GAC TTC GAA AAG CTT ACT
TGA TAG TTC CTT CTG TAC TTG CAA TTC AAG AAG TTG AGA TTG TTC TTT TTC GCA CTG CTG AAG CTT TTC GAA TGA

100                                                 110                                                 120
Asn Tyr Ser Val Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser
AAC TAC TCT GTT ACT GAC CTT AAT GTA CAG CGT AAA GCT ATC CAT GAA CTG ATC CAG GTT ATG GCT GAA CTG TCC
TTG ATG AGA CAA TGA CTG GAA TTA CAT GTC GCA TTT CGA TAG GTA CTT GAC TAG GTC CAA TAC CGA CTT GAC AGG

                    130                                                 140                                 146
Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg Arg Ala Ser Gln Stp
CCG GCT GCT AAA ACT GGT AAG CGT AAA AGA TCT CAG ATG CTG TTC CGT GGT CGT CGT GCT TCT CAG TAA G  3'
GGC CGA CGA TTT TGA CCA TTC GCA TTT TCT AGA GTC TAC GAC AAG GCA CCA GCA GCA CGA AGA GTC ATT CAGCT 5'
```

henstå ved -80°C i 30 minutter, og efter dette tidsrum blev den centrifugeret til udvinding af DNA som sediment. DNA-sedimenterne til blokkene A - F blev opløst i 20 µl destilleret vand, og en 1 µl portion af opløsningen blev undersøgt ved hjælp af elektroforese med 14% polyacrylamidgel indeholdende 7 M urinstof. Som vist i fig. 9, blev der opnået i alt væsentligt ensartede bånd svarende til størrelserne af DNA'erne for de respektive blokke [A] - [F]. DNA-opløsningen til hver af blokkene A - F blev afpasset til sammensætningen af kinasepufferen, og 2 n mol ATP og 6 enheder polynucleotid-kinase blev tilsat. Denne reaktion blev gennemført ved 37°C i 1 time, hvorved blokkenes 5'-ender blev phosphoryleret. DNA til blokkene [A], [B] og [C] (20 p mol hver) blev blandet, og ATP og DTT blev tilsat i koncentrationer på 0,4 mM ATP og 10 mM DTT til fremstilling af ialt 50 µl. Under anvendelse af 8 enheder T4 DNA-ligase blev blandingen derpå omsat ved 15°C i 16 timer. DNA'erne til blokkene [D], [E] og [F] blev også blandet i mængder på 5 p mol hver, og ligationsreaktionen blev gennemført ved 15°C i 16 timer. Efter den ovennævnte reaktion blev der udtaget en portion af hvert reaktionsprodukt, og ligationstilstanden blev undersøgt ved hjælp af elektroforese med 8% polyacrylamidgeler indeholdende 7 M urinstof. Som vist i fig. 10, viste det sig, at blokkene [I] og [II] svarende til 225 bp var blevet syntetiseret. Hele mængden af den ovennævnte reaktionsblanding blev derpå fraktioneret ved hjælp af elektroforese gennem 8% polyacrylamidgeler indeholdende 7 M urinstof. Efter at positionen af de 225 basepar DNA var blevet bekræftet ved hjælp af radioautografi, blev den tilsvarende del af gelen skåret ud, og DNA'en blev elueret ved hjælp af den ovenfor nævnte elektroforetiske elueringsmetode. DNA-opløsningen blev lyofiliseret og opløst i 100 µl 0,3M natriumacetat

(pH 7,0), efterfulgt af tilsætning af 2,5 volumener ethanol, hvorved DNA'en blev udfældet. Til denne DNA blev der sat 0,5 n mol ATP og 3 enheder polynucleotid-kinase, og reaktionen blev gennemført ved 37°C i 1 time på samme måde som tidligere beskrevet. DNA'erne (1 p mol af hver) af blokkene [I] og [II] blev blandet og tilpasset til ligasepuffersammensætningen. Der blev derefter sat ATP og DTT til blandingen i koncentrationer på 0,4 mM ATP og 10 mM DTT til fremstilling af ialt 20 µl. Under anvendelse af 5 enheder T4 DNA-ligase blev ligationsreaktionen udført ved 15°C i 16 timer. Efter reaktionen blev en del af reaktionsblandingen udtaget, og ligationstilstanden blev undersøgt ved hjælp af elektroforese med 6% polyacrylamidgel indeholdende 7 M urinstof. Resultatet er vist i fig. 11. I fig. 11 betegner I og II de isolerede og rensede produkter til henholdsvis blokkene [I] og [II].

Desuden betegner G resultatet af ligation af det samlede γ-IFN-gen, hvilket indicerer, at der blev opnået et DNA-molekyle svarende til 450 basepar.

Til hele mængden af den ovennævnte reaktionsblanding blev der sat 1/10 volumen 3 M natriumacetat, efterfulgt af tilsætning af 2,5 volumener ethanol, hvorved DNA'en blev udvundet som et bundfald. Dette bundfald blev opløst i 100 µl TA-puffer (33 mM tris-acetat, pH 7,9, 66 mM kalium=phosphat, 10 mM magnesiumacetat, 0,5 mM DTT), og der blev tilsat 20 enheder restriktionsenzym EcoRI og 20 enheder restriktionsenzym SalI. Reaktionen blev gennemført ved 37°C i 1 time. Til reaktionsblandingen blev der sat 10 µl 0,3M natriumacetat, og derpå blev der tilsat yderligere 2,5 volumener ethanol, hvorved DNA'en blev udvundet som et bundfald. Denne DNA blev opløst i en opløsning indeholdende

80% formamid, 10 mM NaOH og 1 mM EDTA, og opløsningen blev underkastet elektroforese med 6% polyacrylamidgeler indeholdende 7M urinstof. Efter bekræftelse af 450 basepar ved hjælp af radioautografi blev den tilsvarende gel udskåret og anbragt i et dialyserør. Røret blev fyldt med elueringspufferen, og efter lukning blev elektroforese gennemført i den samme puffer ved en konstant spænding på 200 V i 3 timer, hvorved DNA'en i gelen blev elueret. DNA-opløsningen blev udtaget fra dialyserøret og lyofiliseret. Lyofilisatet blev opløst i 100 µl 0,3M natriumacetat (pH 7,0), og 2,5 volumener ethanol blev tilsat, hvorved DNA'en blev udvundet som et bundfald. Ved hjælp af den ovennævnte fremgangsmåde blev der opnået ca. 0,05 p mol γ-IFN-gen. Denne DNA blev opløst i 10 µl af kinasepufferen, og 2 enheder polynucleotid-kinase og 0,1 n mol ATP blev tilsat. Reaktionen blev gennemført ved 37°C i 1 time for at tilvejebringe DNA til transformation.

Konstruktion af pGIF-plasmid:

Til at udtrykke det kemisk syntetiserede gen som et fuldstændigt protein i Escherichia coli blev et Escherichia coli-plasmid pKO703, hvori γ-IFN-genet kan indføres i modstrøm til UV5-promotor-operatorregionen af Escherichia coli-lactose-operon, konstrueret, og γ-IFN-genet blev klonet i dette pKO703-plasmid.

Detaljer vedrørende konstruktionen af den i dette forsøg anvendte række af plasmider er angivet nedenfor (fig. 8).

(1) Konstruktion af pKO703-plasmid:

Plasmidet pKO703 indeholdende UV5-promotor-operatorregionen

af E.coli-lactose-operon blev konstrueret ved hjælp af den følgende fremgangsmåde.

(A) Fremstilling af pBR322 plasmid med EcoRI og ClaI spaltningssteder fyldt i:

pBR322 DNA (1,5 µg) blev spaltet ved 37°C i 60 minutter med 5 enheder af hver af restriktionsenzymerne EcoRI og ClaI i 20 µl af 1 x TA-blanding (indeholdende 33 mM tris-acetatpuffer, pH 7,6, 66 mM kaliumacetat, 10 mM magnesium=acetat og 0,5 mM dithiothreitol). Reaktionsblandingen blev opvarmet til 65°C i 30 minutter for at inaktivere enzymerne. Tilsætning af 2,5 volumener kold ethanol gav et DNA-bundfald. DNA-bundfaldet blev suspenderet i 40 µl T4 DNA-polymerase-opløsning og opvarmet til 65°C i 10 minutter, efterfulgt af tilsætning af 5 µl af hver af dTTP, dATP, dCTP og dGTP fra de respektive 4mM opløsninger og 5 µl 100 mM β-mercaptoethanol. Blandingen blev derefter omsat med 1 enhed T4 DNA-polymerase ved 37°C i 60 minutter. Reaktionsblandingen blev opvarmet til 65°C i 30 minutter for at inaktivere enzymet og udfældende ethanol. Til slut blev DNA-bundfaldet opløst i 15 µl destilleret vand.

(B) Fremstilling af DNA i Lac UV5-promotor-operatorregionen med EcoRI-spaltningssteder fyldt i:

For at separere UV5-promotor-operatorregionen af lactose-operon blev der gennemført følgende forsøg.

Plasmid pKO601 er et plasmid med lactose-operon-promotor-operator i området mellem to EcoRI-spaltningssteder.

80 µg af dette plasmid pKO601 blev behandlet med 150 enheder

restriktionsenzym EcoRI i 500 µl 1 x TA-blanding ved 37°C i 60 minutter. Reaktionsblandingen blev underkastet 10% polyacrylamidgel-elektroforese. Således blev DNA-fragmentet af promotor-operatorregionen bestående af 95 basepar og med EcoRI-sammenhængende ender skilt fra gelen ved elektroforese. (Vedrørende enkeltheder om separeringsmetoden henvises til japansk patentansøgning nr. 163303/1981, eksemplerne).

Efter ethanoludfældning blev DNA-bundfaldet opløst i 40 µl T4 DNA-polymerase-opløsning, og opløsningen blev opvarmet til 65°C i 30 minutter og derpå hurtigt afkølet. Derefter blev der tilsat 5 µl af hver af dATP, dTTP, dCTP og dGTP fra de respektive 4 mM opløsninger såvel som 5 µl 100 mM β-mercaptoethanol. Blandingen blev omsat under anvendelse af 10 enheder T4 DNA-polymerase ved 37°C i 60 minutter. Reaktionsblandingen blev opvarmet til 65°C i 30 minutter for at inaktivere enzymet, og DNA'en blev udfældet med ethanol. Til slut blev DNA-bundfaldet opløst i 20 µl destilleret vand.

(C) Ligation af de i (A) og (B) fremstillede plasmider til lactose UV5-promotor-operatorregionen og transformationen deraf til Escherichia coli:

Under anvendelse af 0,8 µg pBR322 DNA med EcoRI- og ClaI-spaltningssteder fyldt i, som fremstillet i (A), 0,8 µg af lactose-operon-UV5-promotor-operatorregion DNA, som fremstillet i (B), og 2,5 enheder T4 DNA-ligase blev ligationsreaktionen gennemført ved 16°C i 20 timer.

(Denne ligationsreaktion blev gennemført i overensstemmelse med eksemplerne i japansk patentansøgning nr. 163303/1981).

Efter ligationen blev DNA udfældet fra ethanol og opløst i

10 µl destilleret vand. Under anvendelse af denne DNA-opløsning blev transformation af Escherichia coli K12 WA802 gennemført.

(Denne transformation blev gennemført i overensstemmelse med den fremgangsmåde, der er beskrevet i japansk patentansøgning nr. 163303/1981).

Transformanten blev dyrket på et M9S-X-gal-medium (5 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 5,94 g Na_2HPO_4, 3 g KH_2PO_4 (pH 7,0), 0,2 g $MgSO_4$, 2 g casaminosyre, 5 g glucose, 400 mg 5-brom-4-chlor-3-indoyl-β-D-galactopyranosid, 15 g agar, 1.000 ml vand - i det følgende forkortet til M9S-X-gal-medium) indeholdende 40 µg/ml ampicillin og 10 ampicillinresistente dybblå kolonier taget op og betegnet som WA802/pKO701~WA802/pKO710.

Genkendelsesstedet af restriktionsenzym ClaI på plasmid pBR322 ligger inden for promotor-området af det tetracyklinresistente gen, og hvis et andet DNA-fragment indsættes mellem EcoRi- og ClaI-genkendelsessteder på pBR322-plasmid, bliver Escherichia coli med et sådant plasmid tetracyklinfølsomt. Det forventes imidlertid, at hvis DNA-fragmentet i UV5-promotor-operatorregionen af lactose-operonen indføres med den ønskede retningsbestemmelse, vil transformanten med plasmidet blive tetracyklin-ufølsomt.

Derfor blev de ovenfor opnåede WA802/pKO701 - WA802/pKO710-stammer dyrket ved enkelt-kolonisering på almindelige næringsagarmedier indeholdende 10 µg/ml tetracyklin for at undersøge deres tetracyklin-følsomhed. Det viste sig, at WA802/pKO701, WA802/pKO703, WA802/pKO706 og WA802/pKO709 var tetracyklin-ufølsomme. Plasmid DNA blev derpå skilt fra hver af disse stammer, og 2 µg DNA blev omsat i 1 x TA-blan-

ding med 5 enheder af restriktionsenzymer EcoRI og HpaII ved 37°C i 60 minutter, og retningsbestemheden af lactose-operon-promotor-operatorregionen blev undersøgt ved hjælp af 10% polyacrylamidgel-elektroforese. Det viste sig, at i tilfældet med WA802/pKO703 og WA802/pKO709 var promotor-operatorområdet blevet indsat med den ønskede orientering. Dette pKO703-plasmid blev anvendt ved kloningen af γ-IFN-genet. Plasmidet pKO703 har EcoRI-genkendelsessted modstrøms i transskriptionsretningen fra promotoren, idet pBR322's tetracyklin-resistente gen forbliver intakt på plasmidet, idet genet med de sammenhængende ender af et restriktionsenzym til spaltning af det tetracyklin-resistente strukturgen, såsom EcoRI, SalI og BamHI, opnået kemisk eller fra et plasmid, let kan indføres ved ligation i plasmidet pKO703, og den ønskede klon kan let udvælges som en ampicillin-resistent, tetracyklin-følsom stamme.

(2) Konstruktion af plasmid $pGIF_4$:

I 30 µl 100 mM tris-HCl-puffer (pH 7,3) -5 mM $MgCl_2$ -50 mM NaCl blev 15 µg plasmid pKO703 omsat med 10 enheder af hvert af restriktionsenzymerne EcoRI og SalI ved 37°C i 60 minutter. Reaktionsblandingen blev opvarmet til 65°C i 30 minutter for at inaktivere enzymerne og derpå underkastet 0,7% agarosegel-elektroforese. Ved elektroforese blev 3,8 kb DNA-fragment skilt fra gelen. Efter ethanoludfældning blev DNA opløst i 4,5 µl destilleret vand. Det resulterende EcoRI/SalI-spaltede fragment DNA (0,3 µg) og 5'-OH-ende-phosphorylerede γ-IFN-gen (24 µl), der tidligere var blevet opnået, blev opløst i T4 DNA-ligaseblanding, og opløsningen blev opvarmet til 65°C i 10 minutter. Efter afkøling med is blev der tilsat 3 µl 100 mM DTT og 3 µl 4 mM ATP, og under anvendelse af 3 enheder enheder T4 DNA-ligase blev ligation

gennemført ved 16°C i 20 timer. Efter denne ligationsreaktion blev der tilsat 2,5 volumener kold ethanol, hvorved DNA'en udfældedes. Til denne udfældede DNA blev der sat 10 µl destilleret vand, og transformationen af E.coli WA802 blev gennemført. Transformanten blev dyrket på et M9S-X-gal-medium indeholdende 40 µg/ml ampicillin, og ampicillin-resistente og dybblå kolonier blev udplukket og overført til et almindeligt næringsagarmedium indeholdende 10 µg/ml tetracyklin ved enkelt-kolonisering. Tetracyklin-følsomme kolonier blev udvalgt og betegnet som $WA802/pGIF_1$ - $WA802/pGIF_5$.

Efter separering af plasmid-DNA'er blev hver plasmid-DNA spaltet med restriktionsenzymer EcoRI og SalI, EcoRI og HindIII eller EcoRI og BglII, og størrelserne af DNA-fragmenterne blev målt ved hjælp af agarosegel-elektroforese og polyacrylamidgel-elektroforese. På denne måde blev $WA802/pGIF_4$ og $WA802/pGIF_5$, hvori det ønskede γ-IFN-gen var blevet klonet, bekræftet. I disse plasmider, $pGIF_4$ og $pGIF_5$, er start-codon ATG af γ-IFN-genet placeret i 10 basepar modstrøms til Shine-Dalgano-DNA-basesekvensen i UV_5-promotorregionen af lactose-operonen.

Shine-Dalgano-basesekvens

5' - - AGGAAACAGAATTCATG

- - TCCTTTGTCTTAAGTAC

EcoRI-genkendelsessted.

Identifikation af basesekvensen af et γ-IFN-gen:

Basesekvensen i området, som svarer til 450 basepar γ-IFN-

gener, der kan opnås ved EcoRI/SalI-spaltningen af $pGIF_4$-plasmid-DNA, blev identificeret i overensstemmelse med det i fig. 5 viste. Bestemmelsen af basesekvensen blev udført i overensstemmelse med Maxam-Gilbert-metoden (Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 74, 560-564, 1977). Det blev bekræftet, at i alle de 450 basepar var sekvensen som oprindeligt betegnet (fig. 1-2).

(3) Ekspression og identifikation af humant gamma-interferonlignende polypeptid i E.coli-cellen.

I E.coli WA802/$pGIF_4$ og WA802/$pGIF_5$ blev γ-IFN-genet indført modstrøms til promotorregionen af lactose-operonen. Det måtte derfor forventes, at γ-IFN'et ville blive udtrykt under styring af lactose-operonen. Følgelig blev ekspression og fastgørelse af γ-IFN i cellerne af E.coli WA802/$pGIF_4$ og WA802/$pGIF_5$ gennemført. Hver af E.coli WA802/$pGIF_4$-og WA802/$pGIF_5$-stammerne blev anvendt til at inocculere 2,0 ml M9S-glycerolmedium (5 g NaCl, 1 g NH_4Cl, 5,94 g Na_2HPO_4, 3 g KH_2PO_4, 0,2 g $MgSO_4,7H_2O$, 2,5 g glycerol, 2 g casaminosyre, 1.000 ml vand) indeholdende 40 µg/ml ampicillin,og det inocculerede medium blev inkuberet ved 37°C natten over. Den resulterende kultur blev overført til 4 rør af M9S-glycerolmedium (5 ml) indeholdende 40 µg/ml ampicillin i en størrelse, som giver en ekstinktion (OD 660 nm) på 0,1. Inkubationen blev gennemført ved 37°C, og når OD 660 nm nåede 0,8, blev isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (forkortet: IPTG) som lactose-operon-fremkalder sat til to af de fire rør ved slut-koncentrationen på 1 mM, yderligere efterfulgt af inkubation ved 37°C i 2 1/2 time. De resterende to rør blev inkuberet uden IPTG ved 37°C i 2 1/2 time. En 5 ml portion af hver af disse kulturer blev centrifugeret ved 3.000 omdrejninger pr. minut i 10 mi-

nutter. hvorved celler blev udvundet som et bundfald. Derpå blev 0,5 ml 1 x PBS (10 mM phosphatpuffer, pH 7,0, 150 mM NaCl) indeholdende 1 mg/ml okseserumalbumin sat til hvert af de to rør, hvoraf det ene indeholdt IPTG, og det andet ikke indeholdt IPTG, og cellerne blev revet fra hinanden ved ultralydbehandling. Til hvert af de to resterende rør, hvoraf det ene indeholdt IPTG, og det andet ikke indeholdt IPTG, blev der sat 0,5 ml 1 x PBS indeholdende 1 mg/ml æggehvide-lysozyme. Lysozymebehandlingen blev gennemført ved 0°C i 40 minutter, efterfulgt af ultralydbehandling. 0,5 ml af de fra hinanden revne celler blev centrifugeret ved 25.000 omdrejninger pr. minut i 30 minutter ved 4°C, og den overliggende fraktion blev anvendt til aktivitetsprøven af Y -IFN.

Bestemmelse af interferon-aktivitet:

Under anvendelse af en Coaster's 96-well-plast-multiplade og et Eagle's minimal medium indeholdende 5% føtal kalveserum blev en fortyndingsserie af interferon-prøver fremstillet ved multi-pipettering. Derefter blev 10 µl FL-celler (5 x 10^5 celle/ml) sat til hver well, og dyrkningen blev gennemført ved 37°C natten over i en 5% CO_2-gas-atmosfære. Kulturen i den øverste fraktion blev fjernet, og 100 µl Sindbis virus i en 100 gange så stor koncentration som $TCID_{50}$ blev sat til hver well, og inkubationen blev gennemført ved 37°C natten over i en 5% CO_2-gas-atmosfære. Efter 17 timers forløb blev den overliggende fraktion fjernet, og resten blev tilsat 1% krystal-violet-opløsning indeholdende 20% ethanol. Med hensyn til interferon-styrke blev fortyndingsfaktoren af interferon-prøven, som udviser en halv så stor farvningsintensitet som forskellen i intensiteten af farven mellem den virusfri well og den interferon-

fri virus-tilsatte well, udtrykt i laboratorie-enheder/ml. Dette prøvesystem gav en 7 - 25 gange så stor følsomhed som α-interferon, for hvilken der findes en international standard.

Om interferon-aktiviteten faktisk var human gamma-interferon-aktivitet, blev bekræftet immunologisk ved anvendelse af et anti-humant gamma-interferon-antistof. I dette tilfælde blev 10 µl anti-humant gamma-interferon-antistof (med en tilstrækkelig aktivitet til at inaktivere 2.000 enheder/ml human gamma-interferon-aktivitet) sat til 50 µl af en interferon-aktiv prøve, og efter henstand ved stuetemperatur i 3 timer blev blandingen centrifugeret ved 10.000 omdrejninger pr. minut i 5 minutter. Den overliggende fraktion blev skilt fra med henblik på anvendelse som en prøve.

Som vist i tabel 1, blev det bekræftet, at transformeret E.coli WA802/pGIF$_4$ og WA802/pGIF$_5$ havde dannet et humant gamma-interferon-lignende stof under styring af lactose-operonen, medens ikke-transformanten (WA802/pKO703) ikke udviste denne aktivitet.

E.coli WA802/pGIF$_4$ sønderdelt/centrifugeret overliggende fraktion, som udviste interferon-aktivitet i det ovennævnte eksempel, blev sat til Ultrogel AcA 54 (0,7 cm dia. x 47 cm høj), og dets molekylvægt blev bestemt ved hjælp af gel-permeationskromatografi. Fysiologisk afbalanceret saltopløsning (1 x PBS) blev anvendt til opnåelse af 0,7 ml-fraktioner. Som standardreference-proteiner blev der anvendt ribonuclease A (molekylvægt 13.700), chymotrypsinogen A (molekylvægt 25.000) og ovalbumin (molekylvægt 43.000). Interferon-aktiviteten blev elueret mellem chymo=

trypsinogen A og ovalbumin, og molekylvægten af den maksimale interferon-aktivitet under de ovennævnte betingelser blev bestemt til at være ca. 30.000 (se fig. 12).

TABEL 1.

Resultater af undersøgelser af interferon-aktivitet.

A: Prøverne blev fremstillet ved at sætte BSA til centrifugal-supernatanterne af ultralydbehandlede celler.

	IPTG-induktion	Interferon-aktivitet, laboratorie-enheder/ml		Aktivitet efter behandling med γ-interferon-antistof	
		Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
WA802/pKO703	-	0	0	N.T.	N.T.
(Kontrol)	+	0	0	N.T.	N.T.
WA802/pGIF$_4$	-	0	0	0	0
	+	24	18	0	0
WA802/pGIF$_5$	-	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	+	768	842	0	0

N.T.: Ikke afprøvet.

DK 165750 B

TABEL 1
(fortsat).

B. Centrifugal-supernatanterne af lysozyme-behandlede ultralydbehandlede celler.

	IPTG-induktion	Interferon-aktivitet, laboratorie-enheder/ml		Aktivitet efter behandling med anti-γ-interferon-antistof	
		Prøve 1	Prøve 2	Prøve 1	Prøve 2
WA802/pKO703	-	0	0	N.T.	N.T.
(Kontrol)	+	0	0	N.T.	N.T.
WA802/pGIF$_4$	-	0	0	0	0
	+	272	280	0	0
WA802/pGIF$_5$	-	N.T.	N.T.	N.T.	N.T.
	+	192	280	0	0

N.T.: Ikke afprøvet.

DK 165750 B

Sammenligningsforsøg.

Virkning af DNA-sekvens af et fremmed strukturelt gen på ekspression af det fremmede polypeptid.

Virkningen af strukturelle gener, som har forskellige DNA-sekvenser, men som koder for det samme polypeptid med identisk aminosyresekvens, på ekspressionen af genet blev undersøgt.

Nærmere bestemt blev to slags gener, som koder for humant, interferon-gamma (forkortet som IFN-γ) bestående af 146 aminosyrerester som beskrevet af Gray et al. (Nature 295, 503-508, 1982), og som har forskellige DNA-sekvenser, hvor det ene gen er beskrevet af Gray et al. (herefter forkortet som GIFm), og det andet gen har DNA-sekvensen ifølge opfindelsen (herefter forkortet som GIFs), udtrykt i værtsceller af Escherichia coli under de samme dyrkningsbetingelser, hvorefter udbytterne af IFN-γ blev sammenlignet (TABEL 2).

Metoden til konstruktion af de to vektorer (pGIFm og pGIFs) til ekspression af IFN-γ forklares ikke i detaljer, men vektorerne er illustreret i fig. 13.

GIFm er en cDNA af IFN-γ fremstillet ifølge metoden af Gray et al., og DNA-sekvensen er konstateret at være identisk med den, som er beskrevet af Gray et al.

GIFs er et gen, som er kemisk syntetiseret som beskrevet i det foregående, og som koder for IFN-γ.

Disse to gener har forskellige DNA-sekvenser, men koder begge for et polypeptid (IFN-γ) med identisk aminosyresekvens.

GIFm og GIFs er vektorer med fuldstændig samme struktur, bortset fra at de regioner, som koder for IFN-γ, er forskellige fra hinanden, idet den 3'-ikke-kodende region på 340 DNA-par hos GIFm er nedstrøms for IFN-genet.

Udbytterne af IFN-γ blev undersøgt ved dyrkning af Escherichia coli transformeret med hvert af disse plasmider til ekspression af IFN-γ. Resultaterne er vist i TABEL 2 nedenfor.

TABEL 2

Sammenligning af virkning af promoter på ekspression af IFN-γ-gener med forskellige DNA-sekvenser.

	Mængde af IFN-γ (enhed/ml)		Bemærkninger
Promoter	GIFs	GIFm	
lacUV5*	23,7	1,5	Induceret med IPTG (2 timer)

* En promoter hidrørende fra et beta-galactosidasegen af Escherichia coli.

Udbyttet af IFN-γ ved hver transformant blev bestemt som følger:

Efter fordyrkning blev hver transformant dyrket i 2 ml L-kød-afkog indholdende 40 µg/ml ampicillin, indtil OD når værdier på 0,7 til 0,8. Herefter blev 1 mmol af IPTG (isopropyl-βD-thiogalactopyranosid) blev sat dertil, og dyrkning blev fortsat i yderligere 2 timer.

Cellerne blev efterfølgende opsamlet fra hver resulterende kultur ved centrifugalprecipitering og knust ved frysning og optøning til opnåelse af de pågældende ekstraktopløsninger. Ekstrakternes antivirusaktivitet (enhed/ml) blev bestemt på konventionel måde.

Resultaterne i TABEL 2 viser, at selv når gener koder for det samme polypeptid (i dette tilfælde IFN-γ bestående 146 aminosyrerester) og promoteren er den samme, varierer udbyttet af polypeptid meget.

Med andre ord fremgår det af resultaterne, at selv om gener koder for det samme polypeptid, er deres funktion eller virkning forskellig fra hinanden alt afhængigt af deres DNA-sekvens, og at DNA-sekvensen ifølge opfindelsen er meget nyttig til fremstilling af IFN-γ.

P a t e n t k r a v.

1. Fremgangsmåde til fremstilling af humant gamma-interferonlignende polypeptid, k e n d e t e g n e t ved, at man i et næringsmedium dyrker værtsceller transformeret med et plasmid med et polydeoxyribonucleotid, som har en translationsinitierende kode ved 5'-enden, efterfulgt af en nucleotidsekvens, som består af

```
 1                                   10
TGC TAC TGC CAG GAC CCA TAC GTG AAG GAA GCT GAA AAC CTG AAG
ACG ATG ACG GTC CTG GGT ATG CAC TTC CTT CGA CTT TTG GAC TTC

                  20                                    30
AAA TAC TTC AAC GCT GGT CAT TCT GAC GTT GCT GAC AAC GGT ACT
TTT ATG AAG TTG CGA CCA GTA AGA CTG CAA CGA CTG TTG CCA TGA

                                    40
CTG TTC CTG GGT ATC CTG AAA AAC TGG AAA GAA GAA TCT GAC CGT
GAC AAG GAC CCA TAG GAC TTT TTG ACC TTT CTT CTT AGA CTG GCA

                  50                                    60
AAA ATC ATG CAG TCT CAG ATC GTT TCT TTC TAC TTC AAG CTG TTC
TTT TAG TAC GTC AGA GTC TAG CAA AGA AAG ATG AAG TTC GAC AAG

                                    70
AAA AAC TTC AAG GAC GAC CAG TCT ATC CAG AAA TCT GTT GAA ACT
TTT TTG AAG TTC CTG CTG GTC AGA TAG GTC TTT AGA CAA CTT TGA
```

```
                    80                                                  90
ATC AAG GAA GAC ATG AAC GTT AAG TTC TTC AAC TCT AAC AAG AAA
TAG TTC CTT CTG TAC TTG CAA TTC AAG AAG TTG AGA TTG TTC TTT

                                       100
AAG CGT GAC GAC TTC GAA AAG CTT ACT AAC TAC TCT GTT ACT GAC
TTC GCA CTG CTG AAG CTT TTC GAA TGA TTG ATG AGA CAA TGA CTG

                    110                                             120
CTT AAT GTA CAG CGT AAA GCT ATC CAT GAA CTG ATC CAG GTT ATG
GAA TTA CAT GTC GCA TTT CGA TAG GTA CTT GAC TAG GTC CAA TAC

                                       130
GCT GAA CTG TCC CCG GCT GCT AAA ACT GGT AAG CGT AAA AGA TCT
CGA CTT GAC AGG GGC CGA CGA TTT TGA CCA TTC GCA TTT TCT AGA

                    140                                146
CAG ATG CTG TTC CGT GGT CGT CGT GCT TCT CAG
GTC TAC GAC AAG GCA CCA GCA GCA CGA AGA GTC,
```

hvori TGC / ACG kan være erstattet med TGT / ACA,

som koder for aminosyresekvensen

```
1                                                   10
Cys Tyr Cys Gln Asp Pro Tyr Val Lys Glu Ala Glu
                                20
Asn Leu Lys Lys Tyr Phe Asn Ala Gly His Ser Asp Val
                    30
Ala Asp Asn Gly Thr Leu Phe Leu Gly Ile Leu Lys Asn
40                                                  50
Trp Lys Glu Glu Ser Asp Arg Lys Ile Met Gln Ser Gln
                                        60
Ile Val Ser Phe Tyr Phe Lys Leu Phe Lys Asn Phe Lys
                        70
Asp Asp Gln Ser Ile Gln Lys Ser Val Glu Thr Ile Lys
80                                                  90
Glu Asp Met Asn Val Lys Phe Phe Asn Ser Asn Lys Lys
                                            100
Lys Arg Asp Asp Phe Glu Lys Leu Thr Asn Tyr Ser Val
                        110
Thr Asp Leu Asn Val Gln Arg Lys Ala Ile His Glu Leu
                120
Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr
130                                                 140
Gly Lys Arg Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg Gly Arg

Arg Ala Ser Gln
```

og en efterfølgende nucleotidsekvens, der koder for translationsterminering, indført deri og derved forårsager dannelse af polypeptidet med den ovennævnte aminosyresekvens som proteinkomponent i kultursuppen.

2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at værtscellerne er en stamme, der hører til slægten Escherichia.

3. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at værtscellerne er af en stamme, som hører til arten Escherichia coli.

4. Fremgangsmåde ifølge krav 3, k e n d e t e g n e t ved, at de transformerede værtsceller er af Escherichia coli K12.WA802.

5. Fremgangsmåde ifølge ethvert af de foregående krav, k e n d e t e g n e t ved, at det gamma-interferon-lignende polypeptid udvindes fra kultursuppen.

6. Polydeoxyribonucleotid som defineret i krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at $\begin{matrix}TGC\\ACG\end{matrix}$ er erstattet med $\begin{matrix}TGT\\ACA\end{matrix}$.

7. Polydeoxyribonucleotidet ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at det ud over nævnte sekvens har en translations-initierende kode ved 5'-enden og en translations-terminerende kode ved 3'-enden.

8. Polydeoxyribonucleotidet ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t ved, at det har restriktionsenzym-spaltelige nucleotidsekvenser sat til begge ender.

9. Polydeoxyribonucleotidet ifølge krav 8, k e n d e t e g n e t ved, at 5'-ende-siden kan spaltes med EcoRI, og at 3'-ende-siden kan spaltes med SalI.

10. Plasmid med det i krav 6 - 9 definerede polydeoxyribonucleotid indført deri.

11. Stamme hørende til Escherichia coli og transformeret med plasmidet ifølge krav 10.

Fig. 2

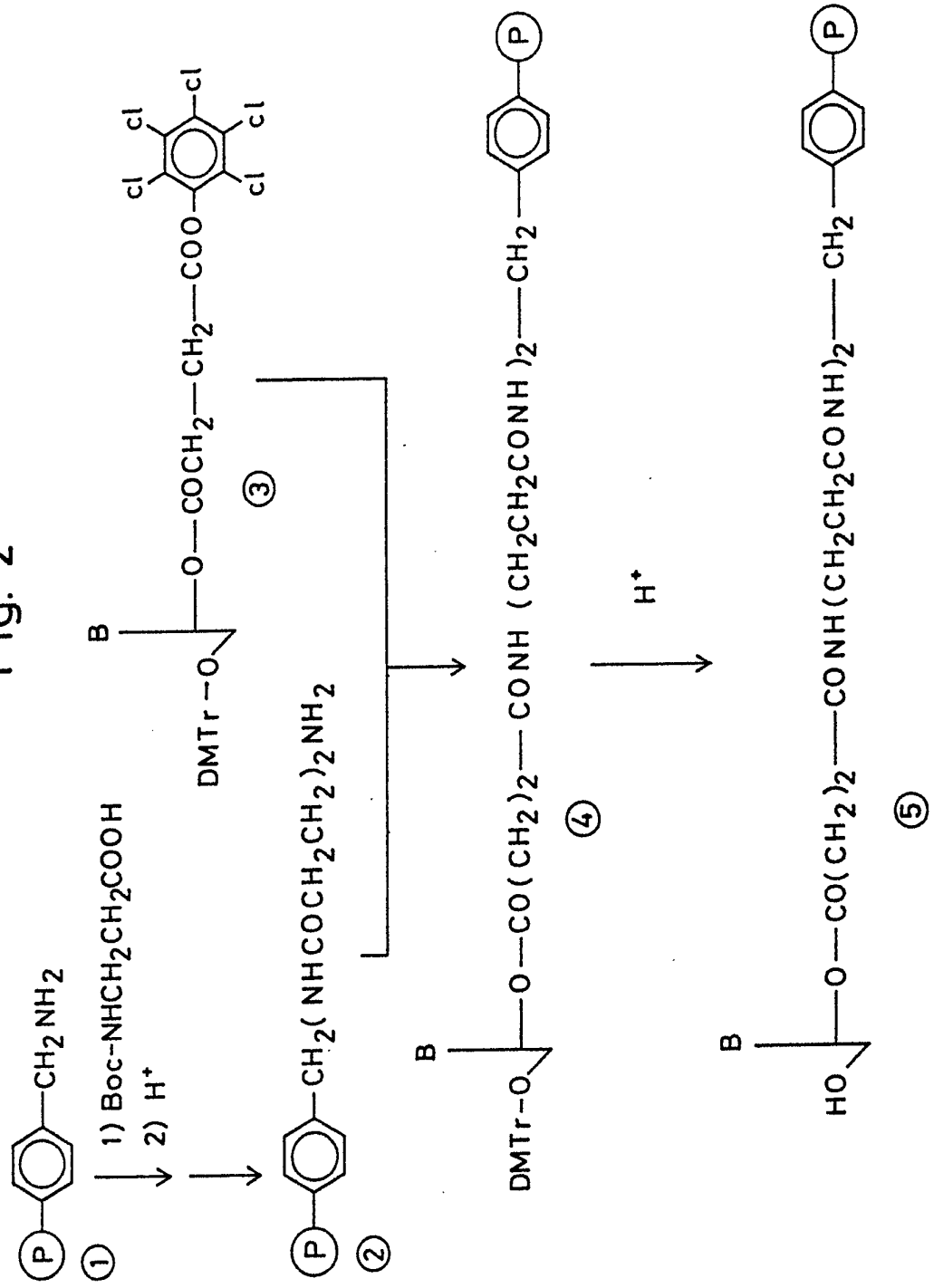


Fig. 3

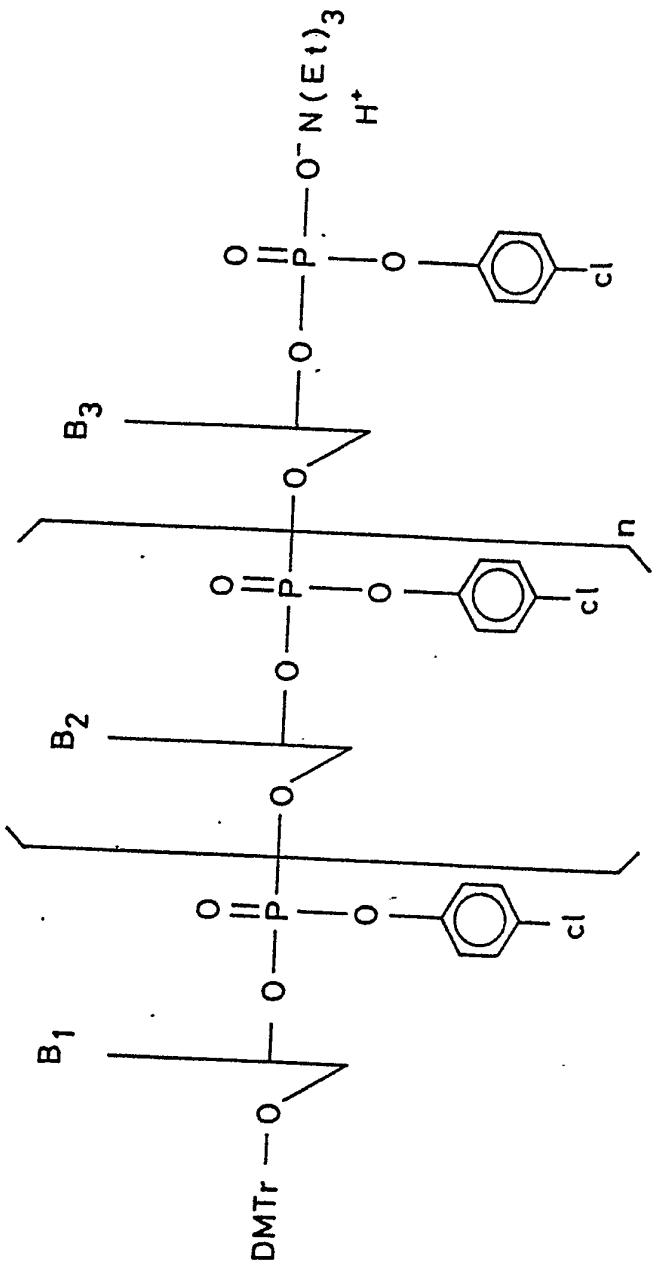


Fig. 4

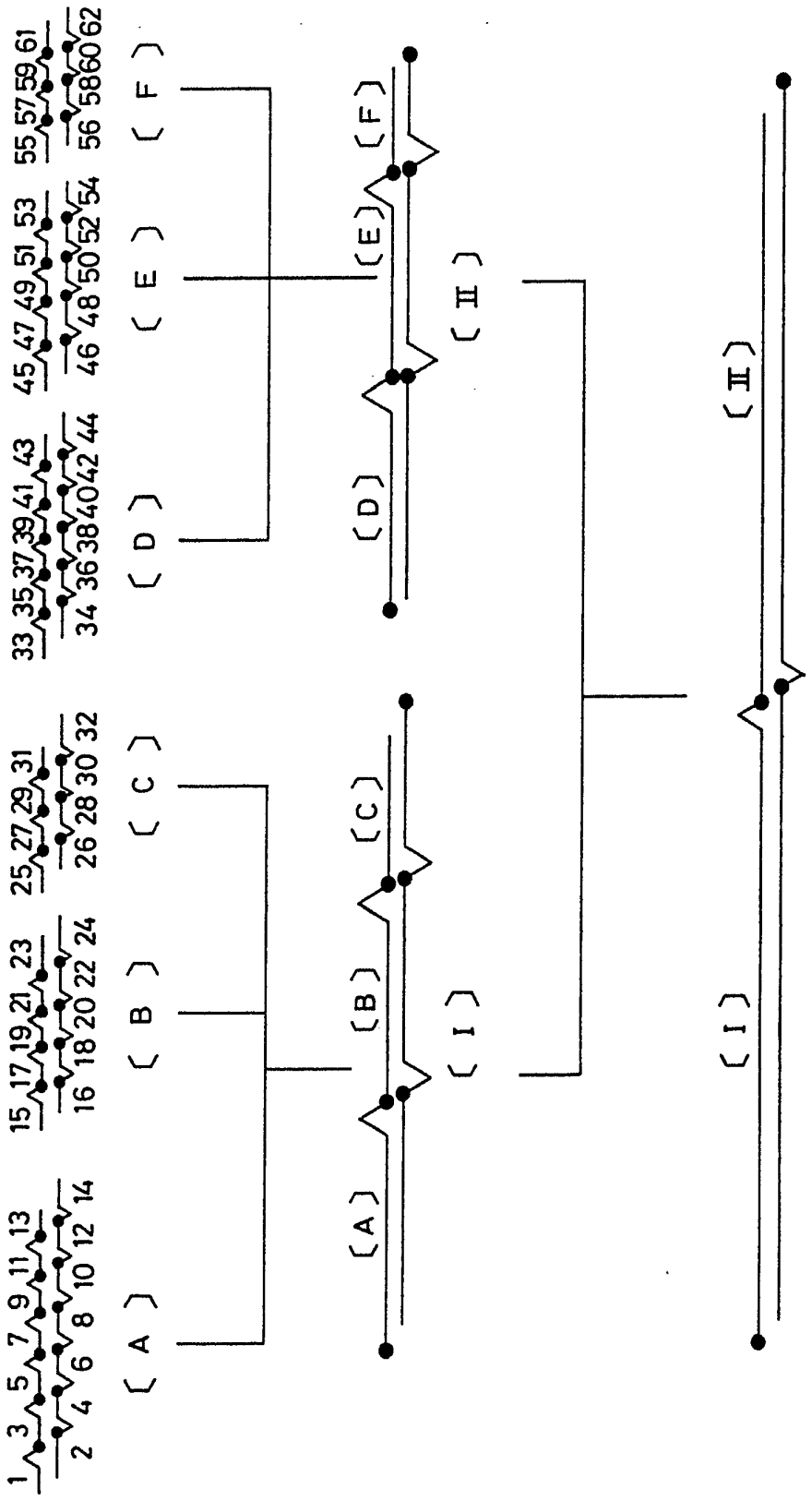
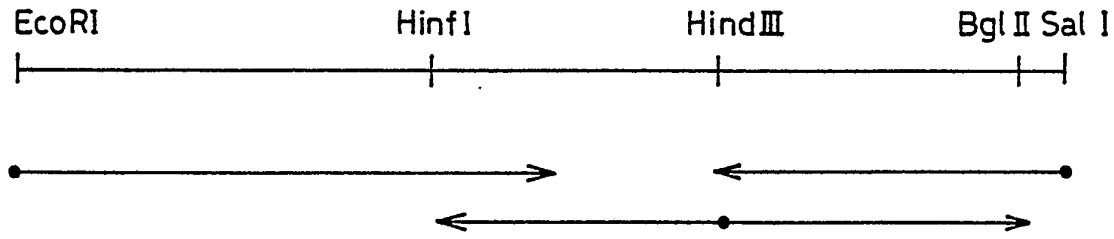

1 3 5 7 9 11 13
2 4 6 8 10 12 14
15 17 19 21 23
16 18 20 22 24
25 27 29 31
26 28 30 32
33 35 37 39 41 43
34 36 38 40 42 44
45 47 49 51 53
46 48 50 52 54
55 57 59 61
56 58 60 62
(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)
(I)
(II)

Fig. 5



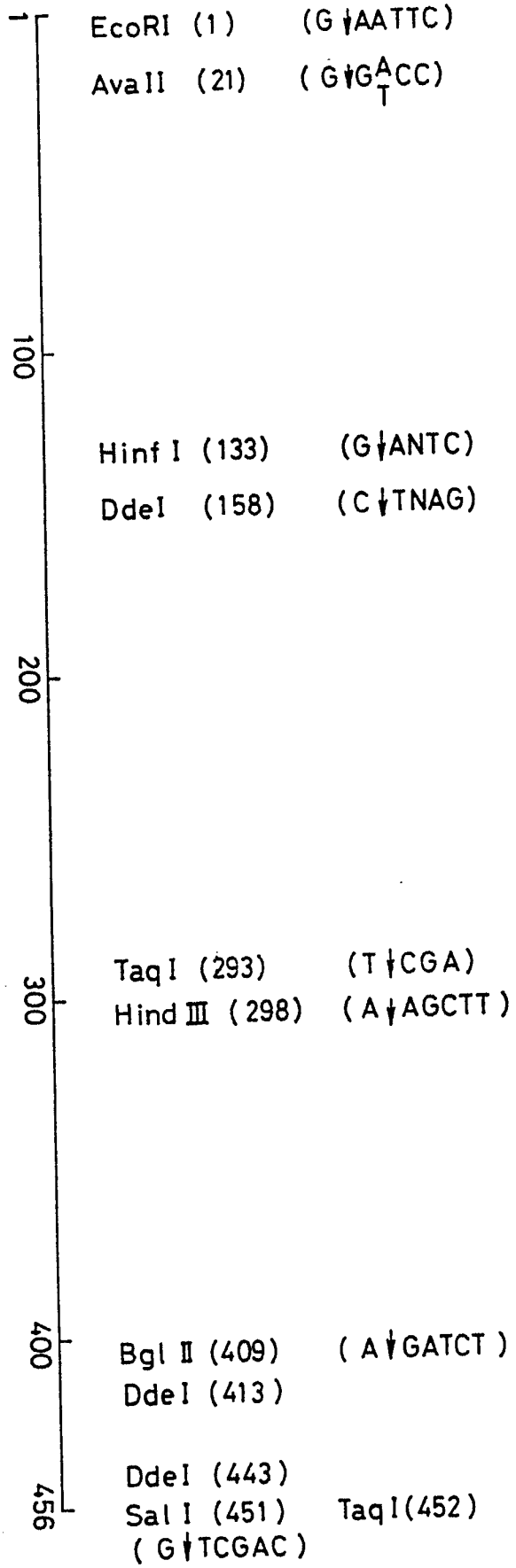

1
100
200
300
400
456
EcoRI (1) (G↓AATTC)
AvaII (21) (G↓G A/T CC)
HinfI (133) (G↓ANTC)
DdeI (158) (C↓TNAG)
TaqI (293) (T↓CGA)
Hind III (298) (A↓AGCTT)
Bgl II (409) (A↓GATCT)
DdeI (413)
DdeI (443)
SalI (451) (G↓TCGAC)
TaqI (452)

Fig. 6

Fig. 7

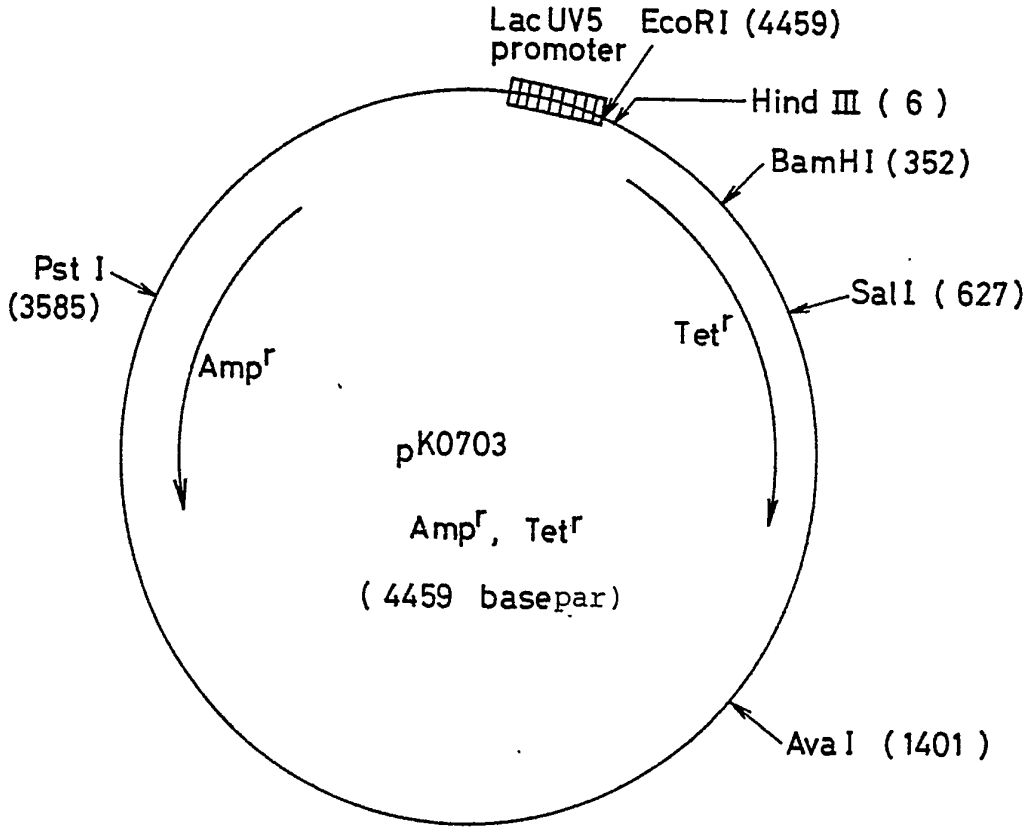

Lac UV5
promoter
EcoRI (4459)
Hind III (6)
BamHI (352)
SalI (627)
Ava I (1401)
Pst I
(3585)
Amp^r
Tet^r
pK0703
Amp^r, Tet^r
(4459 basepar)

Fig. 8

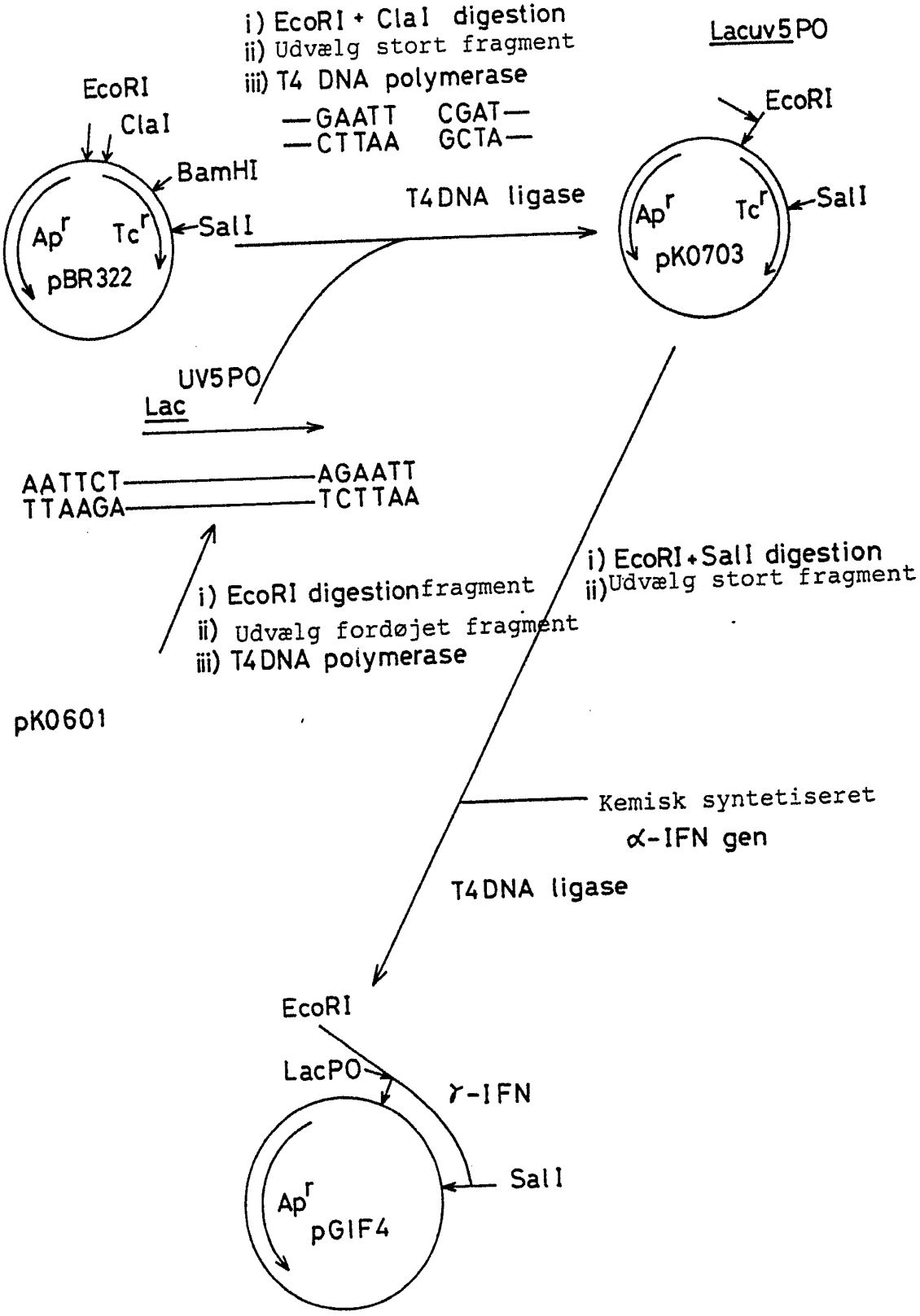

i) EcoRI + ClaI digestion
ii) Udvælg stort fragment
iii) T4 DNA polymerase
—GAATT CGAT—
—CTTAA GCTA—
Lacuv5PO
EcoRI
ClaI
BamHI
SalI
Ap^r
Tc^r
pBR322
T4DNA ligase
pK0703
UV5PO
Lac
AATTCT—AGAATT
TTAAGA—TCTTAA
i) EcoRI digestionfragment
ii) Udvælg fordøjet fragment
iii) T4DNA polymerase
pK0601
i) EcoRI+SalI digestion
ii)Udvælg stort fragment
Kemisk syntetiseret
α-IFN gen
T4DNA ligase
EcoRI
LacPO
γ-IFN
SalI
Ap^r
pGIF4

Fig. 9

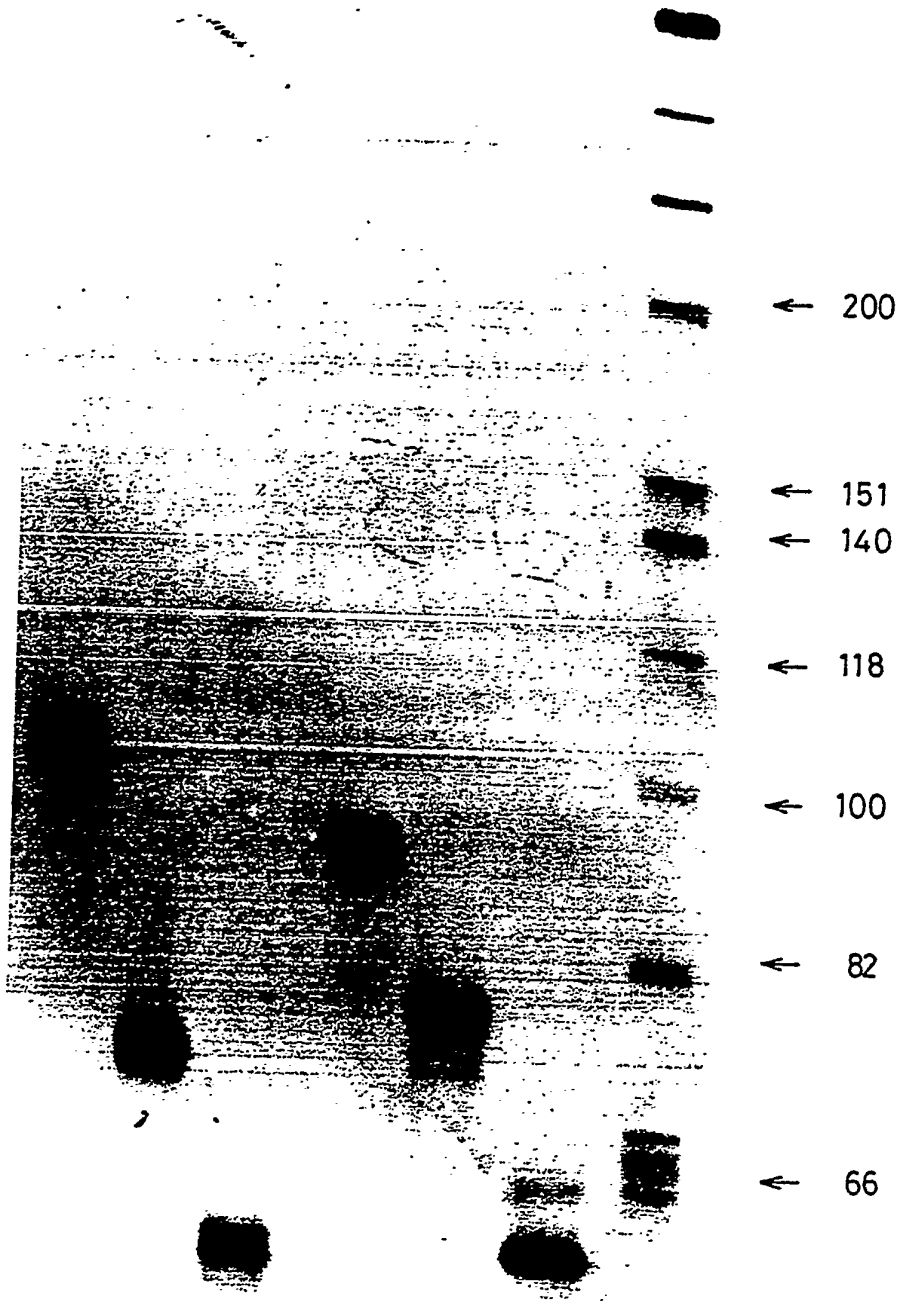


Fig. 10

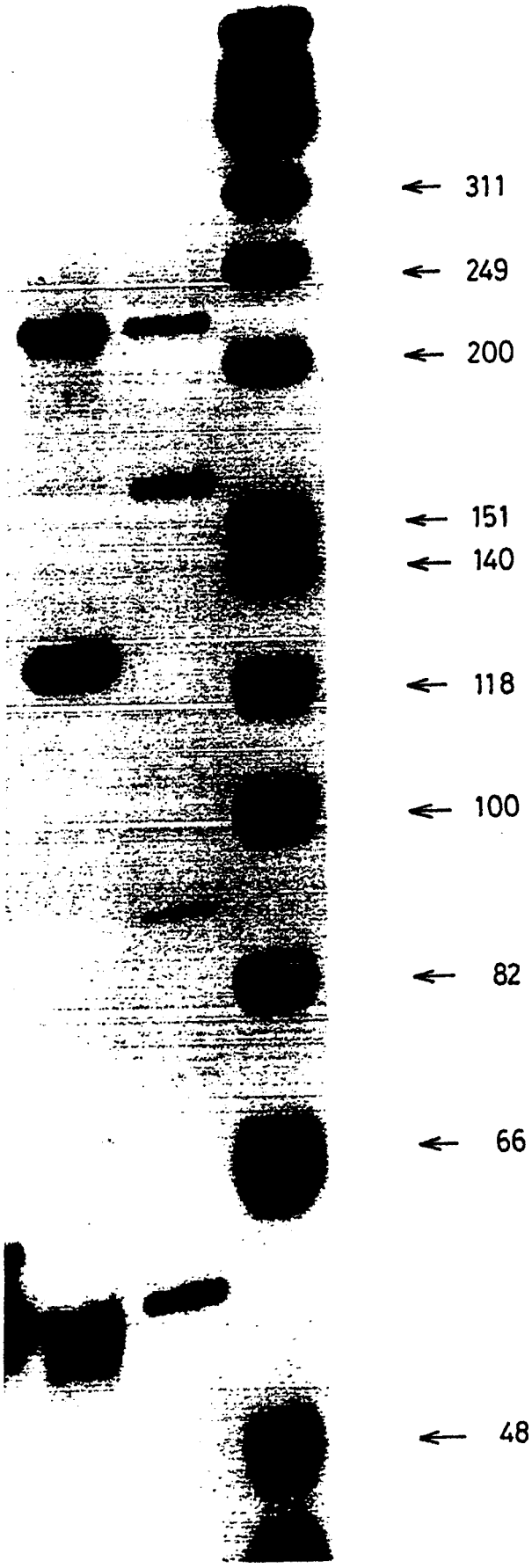


FIG.11

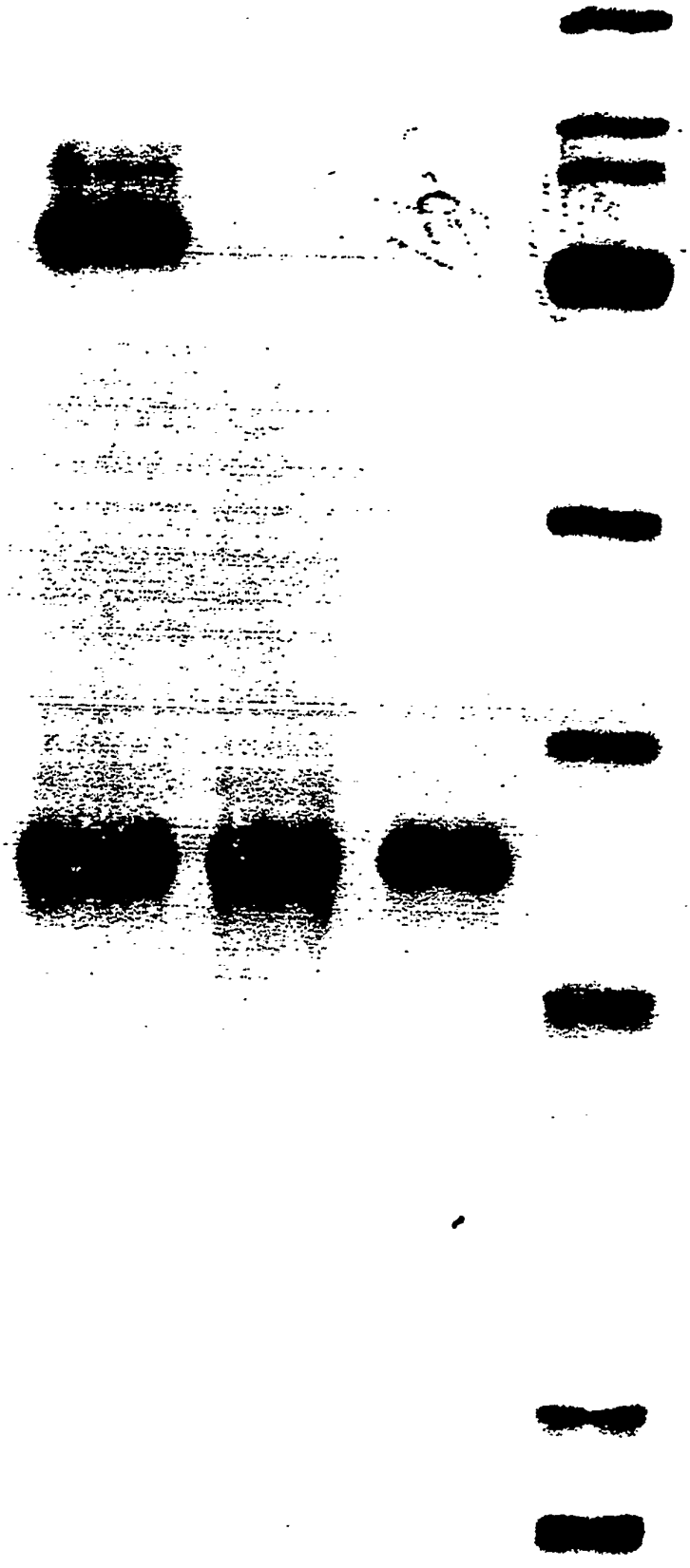
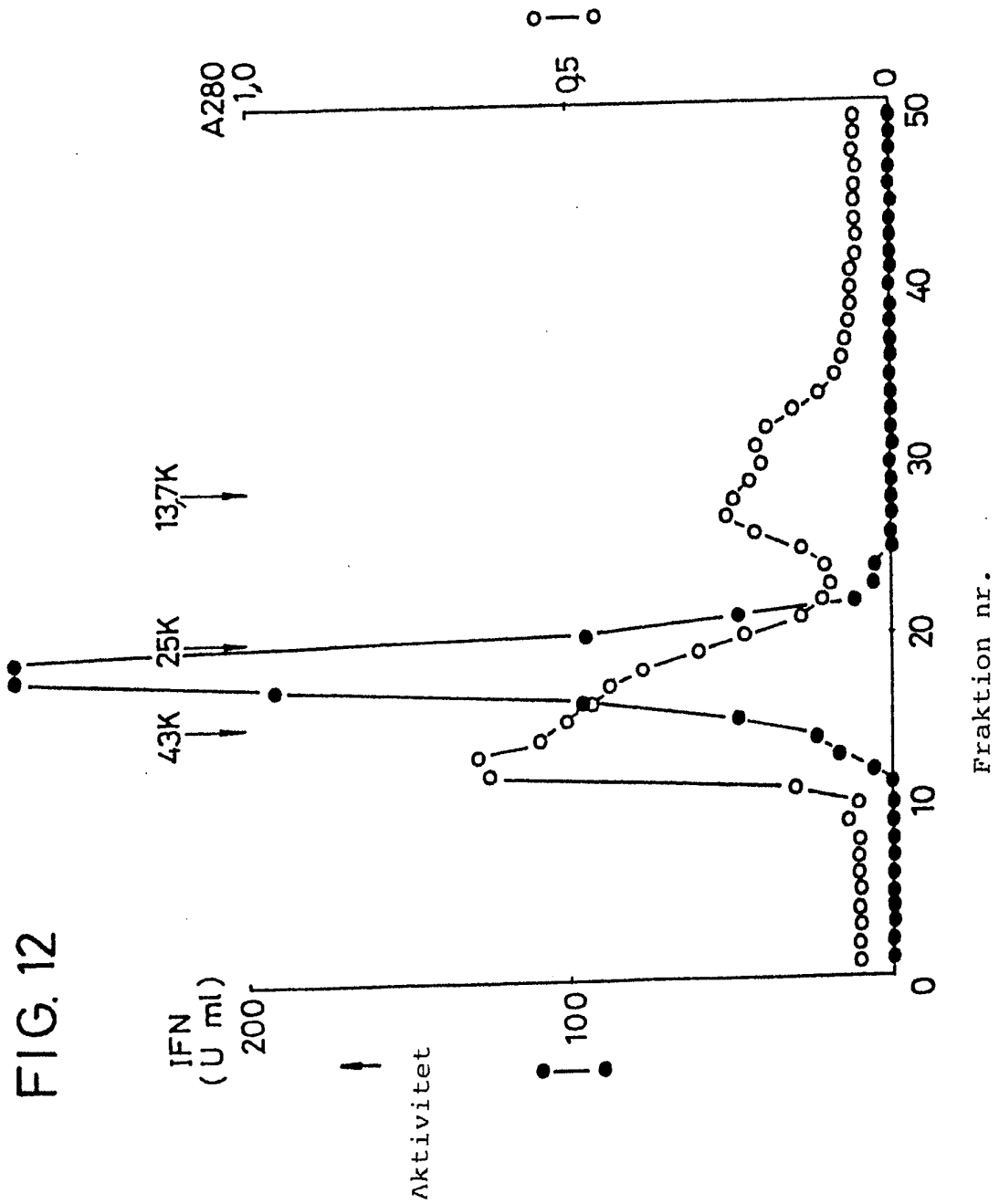


FIG. 12


A280
1,0
0,5
0
IFN
(U ml)
200
100
0
Aktivitet
13,7K
25K
43K
0
10
20
30
40
50
Fraktion nr.

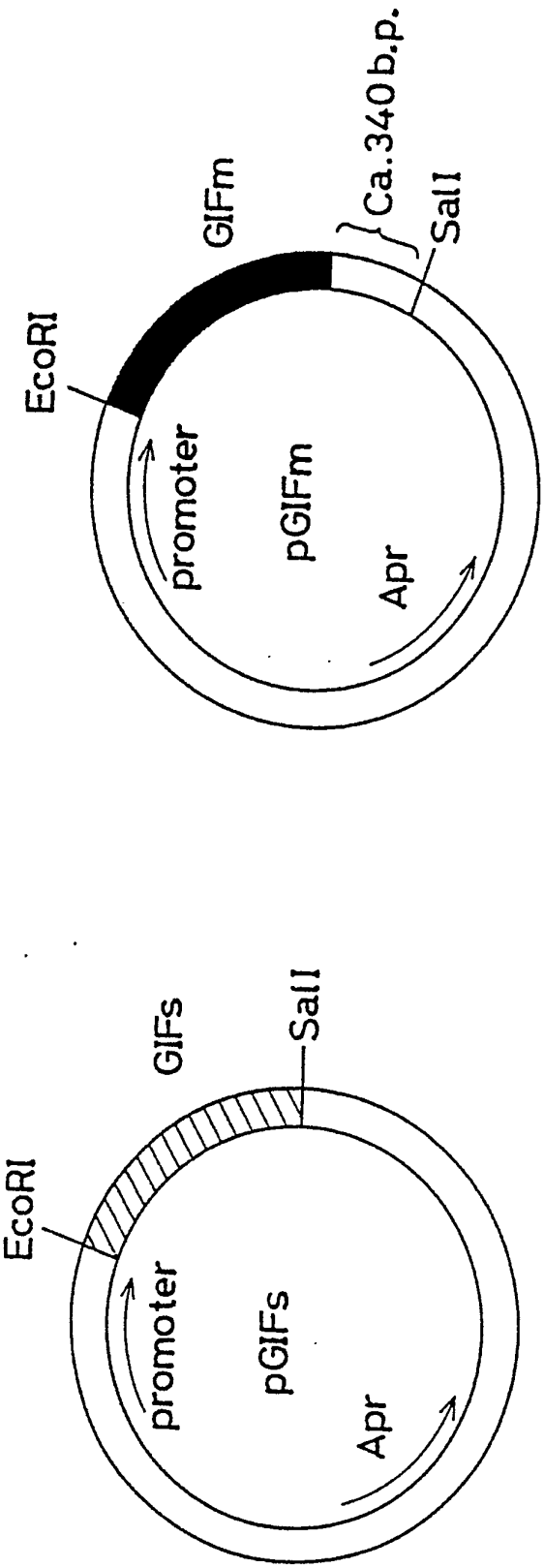


FIG.13 Skitse af ekspressionsvektorerne GIFs og GIFm