

(19) DANMARK

(11)

DK 174905 B1



(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷: C 12 N 15/81 C 12 N 1/19 C 12 N 15/21 C 12 N 15/63 C 12 P 21/02
// (C 12 N 1/19 C 12 R 1:865)

(21) Patentansøgning nr: PA 1983 03614

(22) Indleveringsdag: 1983-08-08

(24) Løbedag: 1983-08-08

(41) Alm. tilgængelig: 1984-02-10

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2004-02-16

(30) Prioritet: 1982-08-09 GB 8222883 1982-12-31 GB 8237026 1983-06-02 GB 8315145

(73) Patenthaver: NOVARTIS AG, Schwarzwaldallee 215, CH-4058 Basel, Schweiz

(72) Opfinder: Bernd Meyhack, Säckingerstrasse 6, 4310 Rheinfelden, Schweiz

Albert Hinnen, Landstrasse 66, 5264 Gipf-Oberfrick, Schweiz

Francois Meyer, Pfaffenrainstrasse 46, 4103 Bottmingen, Schweiz

(74) Fuldmægtig: Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark

(54) Benævnelse: DNA-sekvens og fremgangsmåde til den fremstilling, gærhybridvektorer og *Saccharomyces cerevisiae* indeholdende sekvensen henholdsvis vektoren og fremgangsmåder til deres fremstilling samt deres anvendelse ved fremstilling af polypeptider

(57) Sammendrag:

DNA fragmenter indeholdende en gær sur phosphatase promotor og sidesekvenser, og mutanter deraf, som bibeholder promotorfunktionen, fremstilles ved, at et sur phosphatasegen fremstilles ved komplementering af gærstammer, som mangler sur phosphatase, ved transformering af plasmid DNA fra en gærgensamling indeholdende vildtypekopien af genet, genet isoleres, subkloner af det dannede gen fremstilles, beliggenheden af promotorområdet for ovennævnte underkloner identificeres, og DNA fragmenter indeholdende sur phosphatasepromotoren isoleres.

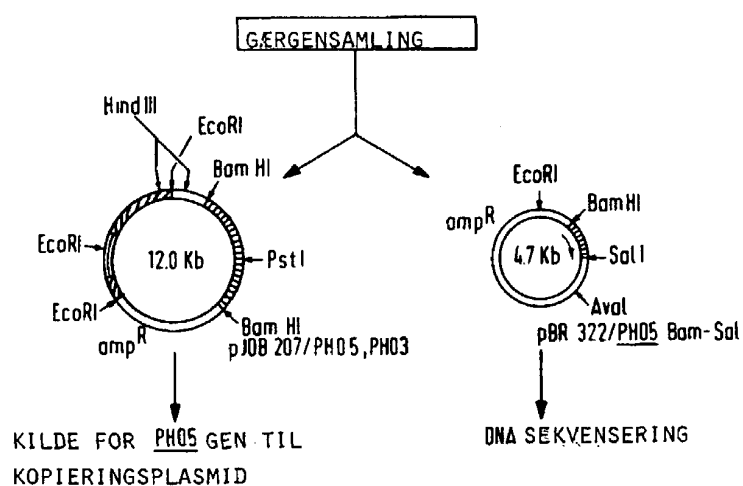
Gær- eller ikke-gærpolypeptider eller naturligt forekommende derivater deraf fremstilles ved dyrkning af gær transformeret med en hybridvektor indeholdende en gær sur phosphatasepromotor og et gær- eller ikke-gærpolypeptidkodningsområde, som er kontrolleret af promotoren, hvorefter det dannede polypeptid isoleres og renses.

Polypeptiderne kan være enzymer, hormoner, polypeptider med immunomodulerende egenskaber, med antivirale egenskaber, med anticancer egenskaber, antistoffer, virus antigener, vaccine eller koaguleringsfaktor, og de kan eksempelvis anvendes som lægemidler.

fortsættes

Fig. 1

UDGANGSPLOSMIDER TIL DNA SEKVENSERING OG KOPIERINGSPLASMID-
DANNELSE



Den foreliggende opfindelse angår DNA-fragmenter indeholdende promotorerne for generne for *Saccharomyces cerevisiae* sur phosphatase, gærhybridvektorer indeholdende disse promotorer, som kan transformere *Saccharomyces cerevisiae*, samt *Saccharomyces cerevisiae* transformeret med disse gærhybridvektorer. Opfindelsen angår tillige fremgangsmåder til fremstilling af DNA-fragmenterne, gærhybridvektorerne samt *Saccharomyces cerevisiae* under anvendelse af rekombinant DNA teknologi. Desuden angår opfindelsen en fremgangsmåde til fremstilling af polypeptider, som er kodet ved hjælp af indsatte gendele i gærhybridvektorerne, og som er nyttige ved behandling af sygdomme hos mennesker og dyr.

Med udviklingen af rekombinant DNA teknologi er det blevet muligt at foretage kontrolleret mikrobiologisk produktion af nyttige polypeptider, især farmakologisk interessante polypeptider. Størsteparten af den hidtil gennemførte forskning indenfor rekombinant DNA teknologien har været gennemført med prokaryote organismer. Som følge af udviklede fremgangsmåder er det nu velkendt at indføre DNA, som koder for eukaryote proteiner, i disse organismer. Adskillige bakteriearter, især *Escherichia coli* stammer, som er blevet modificeret ved hjælp af denne nye teknologi, er nu tilgængelige og muliggør kommerciel fremstilling af polypeptider af meget stor betydning, såsom insulin, humant leukocyt- og fibroblast-interferon og humant væksthormon.

Til mange formål vil det i fremtiden imidlertid være ønskeligt eller nødvendigt at anvende eukaryote systemer ved den kommercielle fremstilling af proteiner, især farmakologisk vigtige proteiner. Da gær hører til eukaryoterne, har de mange biologiske processer tilfælles med andre eukaryoter, især med pattedyrceller. Da mange farmakologisk vigtige proteiner syntetiseres af pattedyrceller, kan slægtskabet mellem de to systemer være fordelagtigt. Eksempelvis ligner sekretionsprocessen i gær sekretionsprocessen i celler hos højerestående dyr, og det er kendt, at gærceller er i stand til at spalte signalsekvenser (uladet N-terminal del af et protein, som sædvanligvis fraspal-

tes under den sekretoriske transport) (47). Glycosylerings-systemet er forbundet med sekretionsprocessen. De grundlæggende trin, som fører til glycosylerede proteiner, ligner hinanden i alle eukaryoter, og det antages, at gærceller
5 i modsætning til prokaryote celler kan danne proteiner, som er glycosyleret nøjagtigt (selv om nogle sluttrin i processen må modificeres).

Endvidere indeholder gærceller ikke endotoksiner. I proteinpræparater fra *Escherichia coli* findes ofte kontaminerende
10 endotoksiner, som skal fjernes ved dyre rensningstrin.

Da gær er en mikroorganisme, er gærceller lette at dyrke. Den cellemasse, som kan opnås pr. rumfang dyrkningsvæske, er væsentligt større for gær end for *Escherichia coli*. Endvidere har man et godt kendskab til gærs opførsel i fermenterings-
15 fasen, og der kendes allerede fremgangsmåder til fermentering i stor målestok.

I de seneste år har bagergær, *Saccharomyces cerevisiae*, vakt stigende interesse blandt molekylærbiologer, som beskæftiger sig med grundforskning og udvikling. Denne udvikling skyldes
20 i stor udstrækning dannelsen af et transformationssystem (Hinnen et al. (1), Beggs (2)), som muliggør anvendelsen af denne mikroorganisme til gensplejningsprocesser, såsom indføring og kloning af heterologt DNA. Ligesom ved de prokaryotiske systemer er plasmider de foretrukne vektorer til anvendelse ved transformering af gærceller, dvs. til indføring af
25 rekombinant DNA i gærceller.

Vektorer, som er egnede til transformering af gærceller, gærceller transformeret med disse plasmider, polypeptider dannet ved hjælp af de transformerede gærceller og fremgangsmåder til deres fremstilling er kendt fra forskellige patentansøgninger og andre publikationer:
30

Den generelle gærtransformeringsmetode er beskrevet af Hin-

nen et al. (1), Beggs (2), Hicks et al. (3) og Struhl et al. (4).

Kopiering af et humant interferon-gen bundet til DNA fragmenter i 5'-sidesekvenserne i *Saccharomyces cerevisiae* alkohol dehydrogenase 1 (ADH1) genet i et plasmid og transformeret
5 til gærceller er beskrevet af Hitzeman et al. (5).

Transformeringen af *Saccharomyces cerevisiae* med et plasmid indeholdende det kromosomale kanin β -globin-gen er beskrevet af Beggs et al. (6). Som anført i denne publikation er genet ikke transkriberet korrekt, og der kunne ikke påvises
10 nogen splejsning af de primære β -globin transkriptionsdele.

Eukaryote celler, såsom gær og især pattedyrceller, som er kotransformeret med fremmed DNA, der koder for et polypeptid, og som er bundet med en inducerbar promotor, og med ubundet DNA, som tillader identificeringen af de transformerede celler, samt en fremgangsmåde til fremstilling deraf er
15 beskrevet i PCT patentansøgning nr. 81/02425 (7).

En DNA sekvens, som koder for et eukaryotisk replikationssted, eukaryote vektorer, som bevirker mitotisk stabilitet ved lavt kopiantal, og som indeholder et eukaryotisk replikationssted, samt gærceller transformeret med disse vektorer er
20 beskrevet i europæisk patentansøgning nr. 48081 (8).

Hybrid DNA'er indeholdende bl.a. et eukaryotisk værtsegment, som kopierer autonomt, en fremgangsmåde til fremstilling deraf samt en fremgangsmåde til højfrekvenstransformering af
25 eukaryote celler, f.eks. gær, med disse hybrid DNA'er, er beskrevet i europæisk patentansøgning nr. 45573 (9).

Plasmider indeholdende ovalbumin-genet kontrolleret ved hjælp af promotoren fra *Escherichia coli* β -lac Z-genet, og som kan transformeres til gærceller, er beskrevet i DE offentliggørelsesskrift nr. 2.923.297 (10) og fransk patentansøgning nr.
30 2.458.585 (11).

Endelig er hybridplasmider indeholdende DNA fra et bakterie plasmid, hele eller dele af DNA'et fra gær 2 μ plasmidet og gær URA3-genet samt gær transformeret med disse hybridplasmider beskrevet i europæisk patentansøgning nr. 11562 (12).

5

I løbet af de senere år er der blevet gjort store fremskridt indenfor gensplejningsområdet, og de første systemer, som anvender genetisk manipulerede mikroorganismer, især stammer af enterobakterien *Escherichia coli*, er nu i drift. Der er imidlertid et behov for andre og bedre systemer, især eukaryote systemer, såsom gær, som er egnede til industriel produktion af proteiner i økonomisk og stor målestok. Forskellige gærvektorer er for tiden tilgængelige til genkloning. Til effektiv kopiering af fremmede gener i gær skal struktur-

15 kodningssekvenser kombineres med kraftige gærpromotorer, som fordelagtigt bør udvise regulatoriske træk, som muliggør eksogen kontrol af genkopiering (gene expression). Det er tillige formålet med opfindelsen at tilvejebringe gærpromotorer, som opfylder disse betingelser. Det er desuden for-

20 målet med opfindelsen at tilvejebringe hybridvektorer indeholdende disse promotorer og fremmede strukturgener kontrolleret af disse promotorer.

25 1. DNA-fragmenter indeholdende sur phosphatase gærpromotorer og deres fremstilling

Ved den foreliggende opfindelse tilvejebringes gærpromotorer, som er blevet isoleret for nylig, og som har gode kopierings-

30 egenskaber, samt en fremgangsmåde til fremstilling deraf.

Gærpromotorerne er afledt af genom DNA'et fra gær, især fra *Saccharomyces cerevisiae*. Mindst to strukturgener (PHO3 og PHO5) og adskillige regulatoriske gener (PHO2, PHO4, PHO80, PHO81, PHO85) indgår i kopieringen af sur phosphatase i gær (jfr. f.eks. reference (13)). PHO5 og PHO3 koder for hen-

holdsvis en repressiv (reguleret) og en strukturel sur phosphatase i gær. PHO5-genet er undertrykt ved høje koncentrationer af uorganisk phosphat og ikke undertrykt ved lav forekomst (starvation) af uorganisk phosphat (sædvanligvis i stor udstrækning under passende fysiologiske betingelser), hvorimod PHO3-genet kopieres strukturmæssigt ved lave koncentrationer. Undertrykkelsesenzymet er glycosyleret og har en molekylvægt på ca. 490 kilodalton (14).

- 10 Promotorerne, som kontrollerer sur phosphatase generne, har ikke været isoleret eller anvendt ved den kendte rekombinant DNA teknologi, og derfor har deres nukleotidsekvenser ikke været klarlagt. I modsætning til andre gærpromotorer anvendt i nyere rekombinant DNA teknologi (f.eks. ADH1), koder DNA
- 15 sekvenserne, som følger direkte efter sur phosphatase gærpromotorerne, for signalpeptider, som antages at indgå i sekretionsprocessen. Det ville være fordelagtigt at binde et område, som koder for et fremmed protein, til en gær-signalsekvens, som sikrer in vivo transport af proteinet gennem
- 20 gærcellemembranen. Det ville resultere i en formindskelse af produktnedbrydning og kontaminering af produktet med materiale fra værtcellen og ville lette produktudvindingen.

- Det er en ulempe ved de hidtil anvendte promotorer i rekombinant DNA teknologi, at de pågældende gener transskriberes
- 25 strukturmæssigt. Det kopierede polypeptid kan enten være toksisk overfor gærcellen (fungicidvirkning) eller kan i det mindste hæmme celleformering (fungistatisk virkning), eller polypeptidet kan nedbrydes enzymatisk i cellen, især
- 30 hvis det udsættes for gærproteaser i lang tid. I alle de nævnte tilfælde vil udbyttet af det ønskede polypeptid være lavt. Disse ulemper kan undgås ved anvendelse af PHO5-promotoren og vektorer indeholdende denne promotor. PHO5-promotoren kan være undertryk eller ikke-undertrykt, idet man blot forøger
- 35 eller formindsker koncentrationen af uorganisk phosphat i mediet. Promotoren kan således være undertrykt under gærens vækstfase og kan være ikke-undertrykt udelukkende under den tidlige stationære fase ved maksimal celletæthed, hvilket

tillader kopiering af genet kontrolleret ved hjælp af PHO5-promotoren. Denne egenskab kombineret med et højt transskriptionsniveau gør, at PHO5-promotoren er den promotor der anvendes i den foreliggende opfindelse.

5

Den foreliggende opfindelse angår et DNA-fragment, som indeholder en undertrykkende *Saccharomyces cerevisiae* sur phosphatase promotor (PHO5) omfattende sekvensen

G

10 ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT
ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA
GGTAAAAGGTTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA
CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAAAGAGTT
15 AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG
CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT
CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT
GAATTGTGCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG
20 CTTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACCA
ATGTTTAAATCTGTTGTTTATTCAATTTAGCCGCTTCTTTGGCCAATGCAGGTACCATT
CCCTTAGGCAAACCTAGCCGATG

25 eller underfragmenter deraf, som bibeholder promotorfunktionen.

Eventuelt efterfølges sur *Saccharomyces cerevisiae* phosphatase promotoren af hele eller en del af signalsekvensen af kodningsområdet for den sure gær-phosphatase, som er naturligt bundet til promotoren. Endvidere kan DNA-fragmentet indeholde sekvenser, som er nødvendige for effektiv translation af mRNA.

35

Foretrukne DNA-restriktionsfragmenter har sekvensen

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT
ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA
5 GGTAAAAGGTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA
CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGAGTT
AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG
CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT
10 CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT
GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG
CTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACCA
ATGTTTAAATCTGTTGTTTATTCAATTTAGCCGCTTCTTTGGCCAATGCAGGTACCATT
15 CCCTTAGGCAAAGTAGCCGATG

og underfragmenter deraf, som bibeholder promotorfunktionen,

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT
20 ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA
GGTAAAAGGTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA
CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGAGTT
AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG
25 CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT
CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT
GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTACTATGG
CTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGGG

30 og

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT
ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA
GGTAAAAGGTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA
35 CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGAGTT
AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG

CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT
 CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT
 GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG
 5 CTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTAGG

Ifølge den foreliggende opfindelse kan et DNA-fragment fremstilles ved, at man

- (A) fremstiller det sure phosphatase PHO5-gen ved komplementering af *Saccharomyces cerevisiae*-stammer, som mangler sur phosphatase PHO5, ved transformering med plasmid DNA fra et *Saccharomyces cerevisiae*-bibliotek indeholdende vildtypekopien af genet og isolerer genet,
- (B) fremstiller subkloner af det dannede gen og
- 15 (C) identificerer beliggenheden af promotorområdet for ovennævnte underkloner og isolerer DNA fragmenter indeholdende sur phosphatase PHO5-promotoren ved restriktionsnedbrydning og til fremstilling af underfragmenter afkorter de dannede DNA restriktionsfragmenter ved nedbrydning med en restriktionsendonuklease eller med en passende exonuklease.
- 20

I det følgende beskrives de enkelte trin, som indgår i fremstillingen af DNA-fragmentet, mere detaljeret:

- 25 (1) Et *Saccharomyces cerevisiae* bibliotek dannes under anvendelse af vild-type gær DNA klonet i et hybrid bakterie-gær-plasmid (især *Escherichia coli*), som indeholder egnede markører, som kan kopiere i både bakterieceller og gærceller (angående egnede markører henvises til det følgende).
- 30
- (2) Kloner indeholdende et sur phosphatase *Saccharomyces cerevisiae*-PHO5-gen, udvælges ved transformation af en gærstamme, som er mangelfuld med hensyn til sur phosphatase PHO5, under anvendelse af plasmidblandinger fra
- 35 ovenstående bibliotek.

- (3) Plasmider indeholdende et sur phosphatase gen isoleres fra den transformerede gær og forstærkes ved tilbage-transformering til *Escherichia coli*, idet der selekteres for den phenotypiske egenskab hos bakteriemarkøren (f.eks. ampicillinresistens).

(2') Med en alternativ metode opdeles genbiblioteket i underdele, som anvendes til at transformere *Saccharomyces cerevisiae* stammer, som er mangelfulde med hensyn til sur phosphatase PHO5, og (3') positive dele opdeles igen og transformeres som ovenfor, indtil en enkelt klon er identificeret.

- (4) Plasmid DNA'et fra den identificerede klon isoleres, nedbrydes med egnede restriktionsendonukleaser, og fragmenterne reklones ind i en passende gærvektor.

(5) DNA-fragmenter indeholdende et sur phosphatase *Saccharomyces cerevisiae*-PHO5-gen kan identificeres ved at transformere *Saccharomyces cerevisiae* stammer, som er mangelfulde med hensyn til sur phosphatase-PHO5 fra gær, med vektorerne. På denne måde kan grænserne for sur phosphatase PHO5-generne bestemmes med en nøjagtighed på ca. 300 basepar.

- (6) DNA-sekvensering af de identificerede fragmenter tjener til lokalisering af PHO5-promotorområderne, sur phosphatase PHO5 proteinkodningsområderne og endvidere restriktionsstedet eller -stederne, som kan være nyttige ved fortsat behandling, f.eks. til afskæring af DNA-sekvenser, som ikke er nødvendige for promotorfunktionen, med restriktionsendonukleaser.

Afhængigt af valget af restriktionsendonukleaserne kan DNA-fragmenterne indeholdende sur phosphatase promotoren også ved 3'- og 5'-enderne indeholde oprindelige side-DNA-sekvenser, som ikke påvirker promotorfunktionen, og som kan anvendes som forbindelsessekvenser i de efterfølgende klonings-

processer. Om ønsket kan disse ekstra sekvenser forkortes ved nedbrydning med en restriktionsendonuklease (om muligt) eller med en egnet eksonuklease, f.eks. Bal31. Endvidere kan fragmenterne bindes til kemisk syntetiserede DNA-binde-
5 led, som fortrinsvis indeholder genkendelsessekvensen fra en passende restriktionsendonuklease. Dette muliggør en hensigtsmæssig binding af sur phosphatase promotoren med fremmed polypeptid kodningsområder. Det er også muligt at isolere og/eller danne et DNA-fragment, som indeholder sur
10 phosphatase *Saccharomyces cerevisiae*-promotoren og hele eller en del af den tilstødende signalsekvens fra sur phosphatase protein-kodningsområdet. Når det dannede hybrid DNA er bundet til et hensigtsmæssigt afskåret fremmed polypeptidkodningsområde, vil det dannede hybrid DNA kopieres i *Saccha-*
15 *romyces cerevisiae* til dannelsen af polypeptider med sur phosphatase signalsekvenser eller sammensmeltede (fused) signalsekvenser.

De omhandlede sur phosphatase *Saccharomyces cerevisiae* promotorer kan anvendes til at kontrollere kopieringen af et
20 gær-polypeptidkodningsområde eller et ikke-gær-polypeptidkodningsområde i en gærhybridvektor.

2. Gærhybridvektorer indeholdende sur phosphatase gærpromotorer og deres fremstilling

25

Den foreliggende opfindelse angår også gærhybridvektorer, der hovedsagelig består af en *Saccharomyces cerevisiae* sur phosphatase (PH05) promotor og et gær-polypeptidkodningsområde eller et ikke-gær-polypeptidkodningsområde, som kontrol-
30 leres af promotoren, med den begrænsning, at det nævnte gærpolypeptidkodningsområde ikke er PH05-genet.

De her anvendte udtryk "vektor", "gærhybridvektor", "DNA-sekvenser" osv. refererer især til dobbeltstrengede DNA'er.
35

Enkeltstrenget DNA er imidlertid også omfattet af disse udtryk. Vektorer og gærhybridvektorer kan være lineære eller har fortrinsvis cirkulær form.

- 5 Gærpolypeptidkodningsområdet (gen) eller ikke-gær-polypep-
kodningsområdet kontrolleret af en af de ovenfor anførte
promotorer kan være afledt af genom DNA eller af cDNA frem-
stillet over mRNA eller kan være fremstillet kemisk. Ikke-
gær-polypeptidkodningsområderne (gener) stammer fra vira,
10 prokaryote celler eller eukaryote celler, herunder fra højere
eukaryote celler, især fra menneskeceller. Når disse gener
kopieres i vært-gærcellen, kan de bevirke fremstilling af
mange forskellige polypeptider, herunder glycosylerede poly-
peptider, såsom enzymer, der f.eks. kan anvendes til
15 fremstilling af levnedsmidler eller til gennemførelse af en-
zymatiske reaktioner i kemien, eller ikke-enzymatiske poly-
peptider, f.eks. hormoner, polypeptider med immunomoduleren-
de, antivirale og anticancer egenskaber, antistoffer, virus
antigener, vacciner, koagulationsfaktorer, fødevarer og lig-
20 nende. Sådanne gener koder f.eks. for amylaser, proteaser,
lysozym, viral thymidin kinase, rennin, β -lactamase, glucose
isomerase, secretin, thymosin, relaxin, calcitonin, somato-
statin, humant væksthormon eller væksthormon fra kvæg, in-
sulin, luteiniseringshormonet, det parathyroide hormon,
25 adrenocorticotropin, β -endorphin, det melanocyt-stimulerende
hormon, β -lipotropin, urogastron, interferon, såsom humant
interferon, f.eks. et humant interferon- α - eller - β -polypep-
tid afledt af humane leukocytceller, lymfoblastoide celler
eller fibroblast celler, eller humant interferon- γ , lymfo-
30 kiner, tumor necrose faktor, anti-rennin-antistof, hepatitis A
virus antigen, hepatitis B virus (HBV) overflade eller kerne
antigener, hepatitis non-A non-B virus antigen, humane histo-
kompatible antigener, mund- og klovsyge virus antigen,

influenza haemagglutinin, fjerkræpest haemagglutinin, serum albumin, ovalbumin, thaumatin, egliner eller plasminogen-aktivatorer.

Et valgt polypeptidkodningsområde kan eventuelt indbefatte
5 en signalsekvens eller en del deraf. Som anført ovenfor kan dette bevirke et kondenseret protein indeholdende PHO5 signalsekvensen eller en hybrid signalsekvens indeholdende dele af PHO5 signalsekvensen og dele af signalsekvensen for det fremmede polypeptid sammen med det fremmede voksne polypeptid.
10 I begge tilfælde favoriseres de kombinationer, som fører til spaltningen af signalsekvensen efter modning af det fremmede polypeptid.

Bortset fra en sur phosphatase promotor og et gær eller et ikke-gær polypeptidkodningsområde kan de omhandlede polypeptidvektorer indeholde yderligere DNA-sekvens eller sekvenser,
15 som er betydningsløse eller mindre vigtige for promotorens funktion, dvs. for kopieringen af polypeptidkodningsområdet, men som kan udøve vigtige funktioner, f.eks. propageringen af gærcellerne transformeret med disse hybrid
20 vektorer. Den eller de ekstra DNA-sekvenser kan fremstilles fra prokaryote og/eller eukaryote celler og kan omfatte kromosomale og/eller extra-kromosomale DNA-sekvenser. Ekstra DNA-sekvenserne kan f.eks. stamme fra (eller bestå af) plasmid DNA, såsom bakteriel eller eukaryotisk plasmid DNA, virus
25 DNA og/eller kromosomal DNA, såsom bakteriel kromosomal DNA fra gær eller højere eukaryoter. Foretrukne hybrid vektorer indeholder yderligere DNA-sekvenser afledt af bakterieplasmider, især Escherichia coli plasmid pBR322 eller beslægtede plasmider, bakteriofag λ , gær 2 μ plasmid og/eller gær kromosomal DNA.
30

Fortrinsvis bærer de yderligere DNA-sekvenser et gær-kopieringsorigin og en selektiv genetisk markør for gær. Hybridvektorer indeholdende et gær-kopieringsorigin, f.eks. det eller de kromosomale selvstændigt kopierende segmenter, holdes
35 ekstrakromosomalt i gærcellen efter transformering og kopieres

selvstændigt ved mitose. Hybridvektorer indeholdende sekvens
homologe til gær 2 μ plasmid DNA kan også anvendes. Disse hy-
bridvektorer vil blive integreret ved rekombination i 2 μ plas-
mider, som allerede findes i cellen, eller de vil kopiere
5 autonomt. 2 μ sekvenser er særligt egnede til højfrekvens-
transformationsplasmider og kan fremkalde høje kopiantal.

Endvidere kan hybridvektorerne ifølge opfindelsen indeholde
en DNA-sekvens fra et gen, som findes i værtsgærkromosomet
(f.eks. PHO5), hvis promotor kan være bundet til gær- eller
10 non-gær-polypeptidkodningsområdet. Som følge af den homologe
sekvens kan hele vektoren indføres stabilt i værtskromosomet
ved rekombination. Under propagering vil de dannede celler
tilbageholde det indførte genmateriale selv uden selektivt
tryk.

15 Med hensyn til den selektive genmarkør for gær kan der an-
vendes et vilkårligt markørgen, som letter udvælgelsen af
transformanter som følge af den fenotypiske ekspresion af
markøren. Egnede markører for gær er især sådanne, som ud-
trykker antibiotisk resistens eller, i tilfælde af auksotrofe
20 gærmutanter, gener, som komplementerer værtslæsioner. Til-
svarende gener giver f.eks. resistens til det antibiotiske
cycloheximid eller tilvejebringer prototrofi i en auksotrof
gærmutant, f.eks. URA3, LEU2, HIS3 eller TRP1 genet. Det er
endvidere muligt som markører at anvende strukturgener, som
25 er forbundet med en selvstændigt kopieringssegment, forudsat
at værtten, som skal transformeres, er auksotrof for det pro-
dukt, som udtrykkes af markøren.

Det er en fordel, at de yderligere DNA-sekvenser, som findes
i hybridvektorerne ifølge opfindelsen, også indeholder et
30 kopieringsorigin og en selektiv genetisk markør for en bak-
terievært, især *Escherichia coli*. Der er nyttige træk for-
bundet med tilstedeværelsen af et *Escherichia coli* kopierings-
origin og en *Escherichia coli* markør i en gærhybridvektor.
For det første kan der fås store mængder hybridvektor DNA

ved vækst og udvidelse i *Escherichia coli*, og for det andet kan opbygningen af hybridvektorer hensigtsmæssigt foretages i *Escherichia coli* under anvendelse af alle mulighederne indenfor klonteknologien baseret på *Escherichia coli*, *Escherichia coli* plasmider, såsom pBR322 og lignende, som indeholder såvel *Escherichia coli* kopieringsorigin som *Escherichia coli* genetiske markører, som medfører resistens overfor antibiotika, f.eks. tetracyclin og ampicillin, og som fordelagtigt anvendes som del af gærhybridvektorerne.

10

De yderligere DNA-sekvenser, som f.eks. kopieringsorigin og genetiske markører for gær og en bakterievært (se ovenfor), betegnes i det følgende som "vektor DNA", som sammen med sur phosphatase promotoren og gær- eller ikke-gær-polypeptidkodningsområdet danner en hybridvektor ifølge opfindelsen.

Gærhybridvektorerne kan fremstilles under anvendelse af kendte fremgangsmåder, f.eks. ved at indføre et DNA fragment, der hovedsagelig består af *Saccharomyces cerevisiae* sur phosphatase (PHOS) promotor, og et gær- eller ikke-gær-polypeptidkodningsområde, som kontrolleres af promotoren, i et vektor DNA.

Der kan anvendes hensigtsmæssigt planlagt (mapped) lineær eller fortrinsvis cirkulær vektor DNA, f.eks. bakterie plasmid DNA eller lignende (se ovenfor), som har mindst ét restriktionssted, fortrinsvis to eller flere restriktionssteder. Det er en fordel, at vektor DNA'et allerede indeholder kopieringsområder og genmarkører for gær og/eller en bakterievært. Vektor DNA'et spaltes ved anvendelse af en passende restriktionsendonuklease. Det spaltede DNA bindes til det DNA-fragment, som indeholder sur phosphatase promotoren, og til DNA-segmentet, som koder for et gær- eller ikke-gær-polypeptid. Inden eller efter bindingen til promotoren og polypeptidkodningsområdet (eller samtidigt dermed), er det også muligt at indføre kopieringsområder og/eller markører for gær eller en bakterievært. I alle tilfælde skal

restriktions- og anelleringsbetingelserne vælges således, at der ikke sker nogen forstyrrelse af de væsentlige funktioner i vektor DNA'et og promotoren. Gærhybridvektoren kan opbygges sekvensvis eller ved sammenbinding af to DNA-segmen-
5 ter, som indeholder alle de sekvenser, som har interesse.

Der kan anvendes forskellige former for teknik til sammenbinding af DNA-segmen-ter in vitro. Korte ender (helt base-parrede DNA duplekser) dannet ved hjælp af visse restriktions endonukleaser kan bindes direkte med T 4 DNA-ligase.
10 Det er mere almindeligt, at DNA-segmen-ter bindes gennem deres enkeltstrengede kohæsive ender og lukkes kovalent ved hjælp af en DNA-ligase, f.eks. T 4 DNA-ligase. Sådanne enkeltstrengede kohæsive ender ("cohesive termini") kan dannes ved
15 spaltning af DNA med en anden type endonukleaser, som danner forskudte eller enkeltstrengede ender (de to strenge i DNA duplekset spaltes forskellige steder i en afstand af nogle få nukleotider). Enkeltstrenge kan også dannes ved addition af nukleotider til korte ender eller forskudte eller enkeltstrengede ender under anvendelse af terminal transferase
20 ("homopolymeric tailing") eller ved simpelthen at fjerne én streng fra et DNA-segment med kort ende med en egnet eksonuklease, såsom λ -eksonuklease. En anden metode til fremstilling af forskudte eller enkeltstrengede ender består i, at der
25 til DNA-segmentet med korte ender bindes et kemisk fremstillet bindings DNA (linker DNA), som indeholder et genkendelsessted for en endonuklease, som danner forskudte eller enkeltstrengede ender, hvorefter det dannede DNA nedbrydes med den pågældende endonuklease.

30

Med henblik på opnåelse af effektiv kopiering skal genet, som koder for et gær- eller ikke-gær-protein, være rigtigt anbragt med hensyn til sekvenserne, som indeholder de transkriptionelle (sur phosphatase promotor) og translationelle
35 funktioner (ribosom bindingssteder). For det første skal bindingen af DNA-segmentet indeholdende promotoren med polypeptidkodningsområdet opnås i den rigtige orientering. Hvis to orienteringer er mulige, kan den korrekte bestemmes ved kon-

- ventionel restriktionsanalyse. Gærhybridvektorer indeholdende et ukorrekt orienteret indsat gen kan genorienteres ved fjernelse af det indsatte gne med en egnet restriktionsendonuklease, hvorefter genet atter bindes med gærhybrid-vektorfragmentet. I alle tilfælde kan ukorrekt orientering undgås ved binding af to DNA-segmenter, som hver har forskellige restriktionssteder ved enderne. Endvidere bør konstruktionen af hybridvektoren gennemføres på en sådan måde, at der kan opnås korrekt transskriptionsinitiering og terminering.
- 10 Med hensyn til det sidste punkt skal transskriptet fortrinsvis ende i en DNA-sekvens afledt af gærkromosom DNA eller 2 μ plasmid. Fordelagtigt slutter transskriptet i en DNA-sekvens indeholdende transskriptionstermineringssignaler fra et gærgen, f.eks. fra PHO5 eller PHO3. For det andet skal der dannes et korrekt aflæsningssystem. Sædvanligvis er nukleotidsekvensen for både promotorområdet og polypeptidkodningsområdet kendt inden bindingen eller kan let bestemmes (f.eks. (15)), således at der ikke er problemer med tilvejebringelse af det korrekt aflæsningssystem. Endvidere kan der være
- 15 behov for specifikke sekundære DNA-strukturer til endnu mere effektiv kopiering af genet.

- Et foretrukket område til binding af sur phosphatase promotoren til en fremmed kodningssekvens er mellem major sur
- 25 phosphatase mRNA starten og ATG'en i sur phosphatase kodningsområdet f.eks. ved anvendelse af PHO5 promotoren indenfor et stræk på ca. 40 bp mellem major PHO5 mRNA starten og ATG'en i PHO5 sur phosphatase kodningsområdet. Til en forbindelse i dette område skal den fremmede kodningssekvens have
- 30 sin egen ATG til translationsinitiering, da den ellers skal forsynes med et yderligere syntetisk oligonukleotid.

- Da mange polypeptider fra højere organismer primært kopieres som præ-polypeptider bestående af signalpeptider knyttet til
- 35 N-termini i fuldt udviklede (mature) polypeptider, kan det være nyttigt at indbefatte en signalsekvens i det indsatte gen. Egnede signalsekvenser er sådanne, der er bundet natur-

ligt til polypeptidgenet, som skal kopieres, eller til sur phosphatase promotoren. Eventuelt kan sammensmeltede signalsekvenser fremstilles ved at sammenbinde (ligere) en del af sur phosphatase signalsekvensen med en del af polypeptid-signalsekvensen. Hvis der ønskes en direkte kopiering af et fuldt udviklet (mature) polypeptid, er det nødvendigt at fjerne signalsekvenser eller dele deraf, som eventuelt følger efter promotorområdet eller eventuelt er anbragt forud for kodningsområdet for det fuldt udviklede polypeptid, f.eks. ved nedbrydning med en eksonuklease, f.eks. med Bal31.

Intermediære produkter, såsom vektorer, der stadig mangler en eller flere vigtige funktioner, samt de endelige gærhybridvektorer ifølge opfindelsen kan transformeres til en bakterievært, især *Escherichia coli*, af de ovenfor anførte årsager (f.eks. produktion af store mængder af henholdsvis intermediære produkter og hybridplasmider). Bakterievektorer, såsom *Escherichia coli* plasmidet pBR322 og de fragmenter deraf, som indeholder et bakteriereplikationsområde og en genmarkør eller -markører, er de mest foretrukne vektorer af denne grund. Ved anvendelse af en sådan bakterievektor omfatter sluttrinene ved fremstillingen af gærhybridvektorer fortrinsvis også indførelsen af en genetisk markør og et kopieringsområde for gær.

DNA-segmenter, som kan indsættes i bakterievektoren til fremstilling af gærhybridvektorerne ifølge opfindelsen, såsom et selvstændigt kopieringssegment (ars, jfr. (4)), sekvenser af gær 2 μ plasmid (2) eller gærmarkør DNA (jf. 16), kan isoleres fra henholdsvis gærkromosomal DNA og gær 2 μ plasmid DNA på konventionel måde. Genet, som koder for et gær- eller et ikke-gær-polypeptid, kan isoleres fra kromosomal eller ekstrakromosomal DNA afledt af cDNA fremstillet via mRNA-vejen (se ovenfor) under anvendelse af konventionel teknik (f.eks. 17, 18) eller kan syntetiseres kemisk.

Ved en foretrukken udførelsesform omfatter fremgangsmåden til fremstilling af gærhybridvektorerne følgende trin:

- (1) dannelse af et *Saccharomyces cerevisiae* bibliotek under anvendelse af vildtype gær DNA,
 - (2) isolering af sur phosphatase genet, især PHO5-genet, og
5 kloning deraf i et bakterieplasmid, såsom pBR322, eller et biologisk funktionelt, især et intakt kopieringsområde og selektionsmarkørholdigt fragment deraf,
 - (3) insætning i plasmidet af en genetisk markør for gær, såsom TRPl-genet, og et gær kodningsområde, såsom et kromosomalt selvstændigt kopierende segment eller alternativt
10 gær 2 plasmidsekvenser i et passende restriktionssted,
 - (4) insætning af et DNA-segment, som koder for et gærpolypeptid eller et ikke-gær-polypeptid, såsom humaninterferon eller HBV overfladeantigen, på en sådan måde, at sur
15 phosphatase promotoren kontrollerer polypeptidkodningssegmentet, og
 - (5) eventuel indsætning af en DNA-sekvens indeholdende transkriptionstermineringssignaler fra et gær-gen, f.eks. fra PHO5, efter (downstream) polypeptidkodningsområdet.
- 20 Det er ligeledes muligt at ændre rækkefølgen af trinene, f.eks. trin 3 til 5, f.eks. ved først at indføre polypeptidkodningssegmentet og derefter at indsætte den genetiske markør og kopieringsområdet for gær i rekombinant-plasmidet dannet i trin 2.
- 25 Inden indsætning af en genmarkør for gær, et gærkopieringsområde og et polypeptidkodningssegment kan man eventuelt fjerne uvæsentlige funktioner, såsom sur phosphatase strukturen, fra rekombinant-plasmidet dannet i trin 2.
- Specielt bindes DNA-segmentet, som koder for et gærpolypeptid eller et ikke-gær-polypeptid, til sur phosphatasepromotoren (trin 4) i området mellem major sur phosphatase mRNA starten og ATG'en i sur phosphatase kodningsområdet. Eventuelt indføres et syntetisk bindeled indeholdende et passende restriktionssted for at tillade forbindelsen mellem DNA-
30 segmentet og sur phosphatase promotoren.

Intermediære gærhybridvektorer indeholdende *Saccharomyces cerevisiae* sur phosphatase promotoren, og som stadig mangler gær- eller ikke-gær-polyeptidkodningssekvensen, kan fremstilles ved hjælp af de ovenfor beskrevne trin (1), (2),
5 (3) og eventuelt (5), hvor sur phosphatase promotoren fortrinsvis er termineret i området mellem major sur phosphatase mRNA starten og ATG'en i sur phosphatase genet og/eller, om ønsket, indføres et syntetisk bindeled indeholdende et passende restriktionssted for at tillade indsættelsen af et
10 DNA-segment, som koder for et gærpolypeptid eller et ikke-gær-polypeptid.

3. Transformation af *Saccharomyces cerevisiae* med gærhybridvektorer indeholdende gær sur phosphatase promotorer.

15 Opfindelsen omfatter tillige en fremgangsmåde til fremstilling af transformerede gærceller, som er i stand til at danne gær-polypeptider eller ikke-gær-polypeptider, ved hvilken *Saccharomyces cerevisiae* transformeres med en vilkårlig af
20 de ovenfor i kapitel 2 beskrevne gærhybridvektorer.

Transformeringen af gær med gærhybridvektorerne kan gennemføres under anvendelse af kendte fremgangsmåder beskrevet i litteraturen, f.eks. i overensstemmelse med fremgangsmåden beskrevet af Hinnen et al. (1). Denne fremgangsmåde kan opdeles i
25 tre trin:

- (1) Fjernelse af gærcellevæggen.
- (2) Behandling af de såkaldte "nøgne" gærceller (spheroplaster) med det transformerende DNA i nærværelse af PEG (polyethylenglycol) og Ca^{2+} -ioner.
30
- (3) Regenerering af cellevæggen og udvælgelse af de transformerede celler i et fast agarlag.

Foretrukne fremgangsmåder er følgende:

- ad (1): Gærcellevæggen fjernes enzymatisk under anvendelse af forskellige glucosidasepræparater, såsom snegletarmsaft (f.eks. Glusulase® eller Helicase®) eller enzymblandinger fremstillet ud fra mikroorganismer (f.eks. Zymolyase®) i osmotisk stabiliserede opløsninger (f.eks. 1 M sorbitol).
- ad (2): Gær-spheroplasterne sammenklumper i nærværelse af PEG, og der induceres lokale fusioner af cytoplasmamembranerne. Dannelsen af sandsynlige sammensmeltningssbetingelser ("fusion-like") er af afgørende betydning, og mange transformerede gær-celler vil blive diploide eller endog triploide under transformationsprocessen. Fremgangsmåder, som tillader selektion af sammensmeltede spheroplaster kan anvendes til koncentrerung af transformanter, f.eks. kan transformerede celler let isoleres blandt forudvalgte fusionsprodukter.
- ad (3): Da gær-celler uden cellevæg ikke deler sig, er det nødvendigt, at cellevæggen regenereres. Denne regenerering gennemføres hensigtsmæssigt ved indlejring af spheroplasterne i agar. Eksempelvis blandes smeltet agar (ca. 50°C) med spheroplasterne. Ved afkøling af opløsningen til gær-dyrkningstemperaturer (ca. 30°C) dannes der et fast lag. Dette agarlag skal forhindre hurtig diffusion og tab af vigtige makromolekyler fra spheroplasterne og derved lette regenereringen af cellevæggen. Imidlertid kan regenerering af cellevæggene også opnås (skønt med lavere virkningsgrad) ved at placere spheroplasterne på overfladen af præformede agarlag.

Det foretrækkes at fremstille regenereringsagaren på en sådan måde, der tillader regenerering og udvælgelse af transformerede celler på samme tid. Da gær-gener, som koder for enzymer ved biosyntetisk aminosyresyntese, sædvanligvis anvendes som selektive markører (jff. kapitel 2), gennemføres regenereringen fortrinsvis i gær-minimalmediumagar. Hvis der imidlertid kræves en meget høj grad af regenerering kan der fordelagtigt anvendes en to-trins-metode: (1) regenerering af cellevæggen i et rigt komplekst medium og (2) udvælgelse af de transformerede celler ved kopi-plettering af cellelaget på selektive agarplader.

Hvis gærhybridvektoren ikke indeholder nogen markørgener, kan de transformerende celler også identificeres ved hjælp af andre fremgangsmåder. Sådanne fremgangsmåder indbefatter f.eks. in situ hybridisering med et mærket DNA-fragment, 5 som er homologt med hensyn til sekvenser i gærhybridkvektoren (f.eks. ifølge Hinnen et al. (1)), in situ immunoanalyse, forudsat at antistoffet for produktet fra det introducerede gen er tilgængeligt, eller andre screeningsmetoder, som bestemmer genprodukter, som er indkodet ved hjælp af det el- 10 ler de transformerende plasmider.

Eventuelt kan gæren kotransformeres med en gærhybridvektor ifølge opfindelsen og en anden vektor indeholdende en genetisk markør for gær. Hvis de to forskellige vektorer har DNA-sekvenser 15 tilfælles (disse kan være bakteriesekvenser, som forekommer i vektorerne), kan der foregå rekombinering, som fører til et sammensmeltet hybridmolekyle, som kan udvælges.

Opfindelsen angår endvidere *Saccharomyces cerevisiae*-varter, 20 som er transformeret med gærhybridvektorer, der indeholder en *Saccharomyces cerevisiae* sur phosphatase (PH05) promotor og et gær- eller ikke-gær-polyeptidkodningsområde.

4. Dyrkning af transformerede gærceller og inducering af poly- 25 peptidsyntese

Gærceller transformeret med selvstændigt kopierende plasmider, f.eks. plasmider indeholdende gær 2 μ plasmid DNA, har i varierende udstrækning tendens til at miste det indførte hybrid- 30 plasmid (jf. (16)). Af denne årsag er det nødvendigt at dyrke sådanne gærceller under selektive betingelser, dvs. betingelser, som kræver kopieringen af et plasmidindkodet gen for vækst. De fleste selektive markører, som anvendes for tiden, er gener, som koder for enzymer for aminosyrebiosyntese eller 35 purinbiosyntese. Dette gør det nødvendigt at anvende syntetiske minimalmedier, som mangler den tilsvarende aminosyre eller purinbase. Nogle gener, som bibringer antibiotisk resistens, kan imidlertid lige så godt anvendes (f.eks. gener,

der bibringer resistens mod cycloheximider eller mod aminoglycosidet G 418 (21)). Gærceller transformeret med vektorer indeholdende antibiotisk resistens gener dyrkes i komplekse medier indeholdende det tilsvarende antibiotikum, hvorved
5 der kan opnås større dyrkningshastigheder og højere celledensiteter.

Gærceller transformeret med DNA integreret i kromosomerne kræver ikke selektive vækstbetingelser. Disse transformerede celler er tilstrækkeligt stabile, til at der kan foregå
10 vækst uden selektivt tryk. På grund af ovenstående forhold dyrkes disse celler fordelagtigt i komplekse medier.

15 Da den regulerede sur phosphatase promotor PHO5 er undertrykkende, er det nødvendigt at tilpasse dyrkningsmediets sammensætning for at opnå maksimale koncentrationer af mRNA transskripter, dvs. vækstmediet skal indeholde uorganisk fosfat i lav koncentration for at ophæve undertrykkelsen (derepression)
20 af PHO5 promotoren.

5. Isolering og rensning af det kopierede polypeptid

Opfindelsen angår tillige en fremgangsmåde til fremstilling
25 af et gær-polypeptid eller et ikke-gær-polypeptid såsom humant interferon eller HBV overfladeantigen, og fremgangsmåden ifølge opfindelsen omfatter følgende trin:

- (1) dyrkning af en *Saccharomyces cerevisiae* stamme transformeret med en gærhybridvektor indeholdende en gær
30 sur phosphatase (PHO5) promotor og et gær- eller ikke-gær-polypeptidpodningsområde under passende næringsbetingelser og
- (2) isolering og rensning af polypeptidet.

35 De transformerede *Saccharomyces cerevisiae* ifølge den foreliggende opfindelse dyrkes i et væskemedium indeholdende

assimilerbare carbon- og nitrogenkilder og uorganiske salte.

Der kan anvendes forskellige carbonkilder. Som eksempler på foretrukne carbonkilder kan nævnes assimilerbare carbon-
5 hydrater, såsom glucose, maltose, mannitol eller lactose, eller et acetat, som kan anvendes alene eller i egnede blandinger. Egnede nitrogenkilder indbefatter f.eks. aminosyrer, f.eks. casamminosyrer, peptider og proteiner og deres nedbrydningsprodukter, såsom trypton, pepton eller kødekstrakt,
10 endvidere gærekstrakt, maltekstrakt, majsstøbevand samt ammoniumsalte, såsom ammoniumchlorid, ammoniumsulfat eller ammoniumnitrat, som kan anvendes alene eller i passende blandinger. Uorganiske salte kan endvidere eksempelvis indbefatte sulfater, chlorider, phosphater og carbonater af natrium, ka-
15 lium, magnesium og calcium.

Dyrkningsmediet kan endvidere også indeholde vækstfremmende stoffer og/eller stoffer, som udøver et selektionstryk med henblik på at forhindre tab af hybridplasmidet. Stoffer, som
20 har vækstfremmende virkning, er f.eks. sporstoffer, såsom jern, zink, mangan og lignende, eller enkelte aminosyrer.

Hvis hybridplasmidet indeholder et gen, som bevirker resistens mod et antibiotisk stof, vil celler indeholdende et sådant
25 hybridplasmid overleve i et medium, der er tilsat det antibiotiske stof, hvorimod celler, som har mistet hybridplasmidet, samt kontaminerende mikroorganismer, som er følsomme overfor antibiotika, ikke vil overleve. Hvis hybridplasmidet indeholder et gen, som tilvejebringer prototrofi i en auxo-
30 trop gærmutant, f.eks. LEU2 genet eller HIS3 genet, kan der udøves et selektionstryk ved at udelade genproduktet, såsom leucin eller histidin, i dyrkningsmediet.

Da den dyrkede *Saccharomyces cerevisiae* er blevet transforme-
35 ret med et hybridplasmid indeholdende den regulerede sur phosphatase promotor PHO5, må indholdet af uorganisk phosphat

i dyrkningsmediet formindskes efter fordykningsfasen for at sikre maksimale koncentrationer af mRNA transskriptor og følgelig maksimale udbytter af polypeptider.

- 5 Dyrkningen gennemføres under anvendelse af konventionel teknik. Dyrkningsbetingelserne, såsom temperatur, pH-værdi i mediet og fermenteringstiden, vælges på en sådan måde, at der opnås maksimale koncentrationer af polypeptider. En *Saccharomyces cerevisiae* dyrkes fortrinsvis under aerobe
10 betingelser i submers kultur med rystning eller omrøring ved en temperatur fra ca. 25 til ca. 35°C, fortrinsvis ved ca. 30°C, ved en pH-værdi på 4-8, f.eks. i en pH-værdi på ca. 7, og i ca. 4 til ca. 20 timer, fortrinsvis indtil der er opnået maksimale polypeptidudbytter.

15

- Når de transformerede *Saccharomyces cerevisiae* er dyrket til en tilfredsstillende celletæthed, består det første trin til udvinding af det kopierede polypeptid i frigørelse af polypeptidet fra cellens indre. Ved de fleste metoder
20 fjernes cellevæggen først ved enzymatisk nedbrydning med glucosidaser (jf. afsnit 3). Derpå behandles de dannede sphæroplaster med detergenter, såsom "Triton"®. Eventuelt kan der til oplukning af cellerne anvendes mekaniske kræfter, såsom forskydningskræfter (f.eks. X-presse, fransk presse)
25 eller rystning med glasperler. Den dannede polypeptidblanding kan koncentrerer med hensyn til det ønskede polypeptid på konventionel måde, f.eks. ved fældning med ammoniumsulfat eller trichloreddikesyre, gelelektroforese, dialyse, kromatografi, f.eks. ionbytterkromatografi, størrelsesudelukkelses-
30 kromatografi, HPLC eller HPLC med omvendt fase og lignende. Den endelige rensning af det forrensede produkt kan f.eks. opnås ved antistofaffinitet-kromatografi. Principielt kan rensningstrinnene (bortset fra lyseringen af cellerne) gennemføres i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge Stachelin et al. (22) udviklet til human leukocyt interferon.

Eksempelvis kan isoleringen og rensningen af det ønskede polypeptid gennemføres under anvendelse af følgende trin:

- (1) lysering af gærcellerne med glucosidase,
- (2) behandling med et detergent,
- 5 (3) fjernelse af størsteparten af ikke-proteinmaterialet ved behandling med polyethylenimin,
- (4) fældning af polypeptiderne ved mætning af opløsningen med ammoniumsulfat,
- (5) dialyse i en passende pufferblanding,
- 10 (6) søjlekromatografi på DEAE-cellulose,
- (7) affinitetskromatografi på en monoklonal antistofsøjle og
- (8) adskillelse efter molekylstørrelse på en passende "Sephadex"®-søjle.

15

For at opnå et tilstrækkelig rent produkt kan det vise sig at være nødvendigt at anvende yderligere rensningstrin, f.eks. kationbytterkromatografi eller anionbytterkromatografi, adsorption på hydroxylapatit, HPLC med omvendt fase osv. På

20 den anden side kan et eller flere af de omtalte trin eventuelt udelades, eller rækkefølgen af trinene kan ændres.

Når det ønskede polypeptid udskilles af *Saccharomyces cerevisiae* i det periplasmatiske rum, kan der anvendes en simplificeret fremgangsmåde: Polypeptidet kan udvindes uden lyse-

25 ring af cellerne ved enzymatisk fjernelse af cellevæggen eller ved behandling med kemiske midler, f.eks. thiolreagenser eller EDTA, som fremkalder beskadigelse af cellevæggen, hvilket muliggør frigørelse af polypeptidet. I det tilfælde,

30 hvor polypeptidet udskilles til dyrkningsvæsken, kan det udvindes direkte derfra.

Polypeptiderne, som kan fremstilles ifølge den foreliggende opfindelse, er nyttige og værdifulde til behandling eller

35 forebyggelse af sygdomme hos mennesker og dyr, (f.eks. interferon, HBV overfladeantigen, osv.), eller de kan anvendes som levnedsmidler, foder, foderadditiver eller i enzymatiske

reaktioner (jf. 2 ovenfor). Det er klart, at fremstillingen af naturligt forekommende derivater af polypeptiderne, såsom proteolytisk spaltede polypeptider og/eller glycosylerede polypeptider, også er omfattet af den foreliggende opfindelse.

Opfindelsen angår især DNA-fragmenterne, gærhybridvektorerne, den transformerende *Saccharomyces cerevisiae* og fremgangsmåderne til fremstilling af polypeptiderne som beskrevet i eksemplerne.

Opfindelsen forklares nærmere i det følgende under henvisning til tegningen:

Fig. 1 viser en partiel restriktions-endonuklease-plan for plasmiderne pJDB207/PHO5, PHO3 og pBR322/PHO5Bam-Sal anvendt som kilder for henholdsvis PHO5 genet og DNA sekvensering.

Fig. 2 viser lokaliseringen af PHO5 og PHO3 sur phosphatase generne i et 5,1 Kb BamHI fragment isoleret fra en gær-gen-samling.

Fig. 3 viser DNA sekvensen i promotorområdet for PHO5.

Fig. 4 er et skematisk diagram, som viser konstruktionen af plasmiderne p30IFN2(8₁') og p30IFN2'(8₁').

Fig. 5 viser bindingen af PHO5 promotor DNA med IFN-8₁' cDNA ved dannelsen af plasmid p30IFN1(8₁').

Fig. 6 viser skematisk konstruktionen af plasmid pJDB207/IFN2'(8₁').

Fig. 7 viser skematisk konstruktionen af rekombinant DNA molekyler indeholdende Namalwa cDNA.

Fig. 8 illustrerer skematisk den anvendte teknik til fremstillingen af den IFN mRNA specifikke 13mer DNA primer.

- Fig. 9 viser skematisk identificeringen af kloner indeholdende human lymfoblastoid IFN cDNA.
- Fig.10 -14 viser DNA-sekvenserne og tilsvarende aminosyre-sekvenser i de indsatte cDNA'er i plasmiderne
- 5 CG-pBR322/HLycIFN-1'b, $-\beta_1$, -4_1 , -8_1 og -5_1 .
- Fig.15 viser dannelsen af plasmidet CG-pBR(AP)/LyIFN- α -1, og fig.16 viser DNA- og aminosyresekvenserne i det indsatte cDNA.
- Fig.17 illustrerer dannelsen af plasmid CG-pBR(AP)/LyIFN- α -3 og fig. 18 viser DNA- og aminosyresekvenserne i det indsatte
- 10 cDNA.
- Fig.19 viser DNA- og aminosyresekvenserne i det indsatte cDNA i plasmid CG-pBR(AP)/LyIFN- α -2.
- Fig.20 illustrerer dannelsen af plasmid p31 indeholdende et PHO5 termineringsfragment.
- 15 Fig.21 viser nukleotidsekvensen for Sau3A-PstI PHO5 transkriptionstermineringsfragmentet.
- Fig.22 viser skematisk dannelsen af plasmiderne p31/IF1(5_1), p31/IF2(5_1), p31/IF3(5_1) og p31/IF2(1'b).
- Fig.23 illustrerer skematisk dannelsen af plasmid p31/IF(8_1).
- 20 Fig.24 viser skematisk dannelsen af en korrekt PHO5-HBVs-samling i plasmid pBR322/PHO5/HBVs Δ 14.
- Fig.25 viser DNA-sekvensen omkring PHO5 promotor- og HBVs-kodningsområdefusionspunktet i plasmid pBR322/PHO5/HBVs.
- Fig.26 viser skematisk dannelsen af gærkopieringsplasmiderne
- 25 pJDB207/PHO5/HBVs Δ 14 og pJDB207/PHO5/HBVs Δ 14t.
- Fig.27 viser skematisk dannelsen af gærkopieringsplasmiderne pJDB207/IF2(1'b) Δ og pJDB207/IF2(5_1) Δ 72.
- Fig.28 viser nukleotidsekvenserne for plasmiderne pJDB207/IF2(5_1) Δ 72 og pJDB207/IF2(5_1) Δ 82 omkring XhoI-samlingen
- 30 mellem det 3'-ikke-translaterede område i IFN- 5_1 og PHO5 transskriptionsterminerings-området.
- Fig.29 viser dannelsen af plasmid CG-pBR322/HLycIFN(α -3)-252.
- Fig.30 viser strukturerne af plasmiderne CG-pBR322/HLycIFN(α -2)-261 og CG-pBR322/HLycIFN(α -1)-258.
- 35 Fig.31 viser skematisk fremgangsmåden til udslettelse af PHO5 signalsekvensen i kopieringsplasmid p31 og specielt dannelsen af plasmid p31/R.

Fig.32 viser skematisk samlingen af kloner dannet ved den i fig.31 illustrerede fremgangsmåde.

Fig.33 og 34 viser nukleotidsekvenserne i BamHI-EcoRI-restriktionsfragmenterne indeholdende PHO5/R og PHO5/Y promotorområderne.

Fig.35-37 viser skematisk fremgangsmåden til indsættelse af IFN- α -3, - α -2 og - α -1 DNA i plasmid p31/R.

Fig.38 viser skematisk dannelsen af plasmid pJDB207R/IF(α -3).

Opfindelsen illustreres nærmere i de efterfølgende eksempler.

10 I eksemplerne anvendes følgende forkortelser:

EtBr: ethidiumbromid

BSA: okseserumalbumin

DTT: 1,4-dithiothreitol (1,4-dimercapto-2,3-butandiol)

EDTA: ethylendiamintetraeddikesyre

15 SDS: natriumdodecylsulfat

TNE: opløsning indeholdende 100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), og 1 mM EDTA

Tris-HCl: tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, pH-værdi indstillet med HCl

20 PMSF: phenylmethansulfonylfluorid

TE: opløsning indeholdende 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) og 1 mM EDTA.

Eksempel 1.

Dannelse af et *Saccharomyces cerevisiae* bibliotek

- 25 30 μ g gær DNA med total høj molekylvægt (23) fra vildtype *Saccharomyces cerevisiae* stamme S288C inkuberes i 30 minutter ved 37°C med 2 enheder EcoRI methylase (New England Biolabs) i 250 μ l EcoRI metyleringspuffer som anbefalet af leverandøren. DNA fældes med ethanol, resuspenderet i 500 μ l 25 mM
- 30 Tris-HCl pH 8,5, 2 mM MgCl₂ (EcoRI* puffer) (24) og nedbrydes med EcoRI (Boehringer), indtil størrelsesfordelingen for DNA-fragmenterne har et maksimum i området 30-50 kb (en XhoI ned-

brydning af λ DNA giver omtrentlig 33 kb og 17 kb markører). Går DNA'et nedbrudt under EcoRI* betingelser fraktioneres med hensyn til størrelse på en saccharose-gradient (5-20% saccharose i 10 mM Tris.HCl pH 7,5, 1 mM EDTA) i 6 timer ved 38.000 omdrejninger pr. minut i en SW 40 rotor. 30 Fraktioner, hver på 0,4 ml, udtages fra toppen af gradienten. Fraktion 16 indeholder DNA-fragmenter med en størrelse på 30-40 kb. DNA'et i denne fraktion (3 μ g) fældes med ethanol og bindes i 16 timer ved 15°C i samlet rumfang på 15 μ l til 1 μ g kosmid vektor pYcl (25), lineariseret med EcoRI. Bindingen gennemføres med 300 enheder T4 DNA ligase (New England Biolabs) under anvendelse af puffersystemet beskrevet af leverandøren. DNA'et indføres in vitro i bakteriofag λ (26), og de samlede fager anvendes til at transducere Escherichia coli stamme HB101 (r_k^- , m_k^- , leu^- , pro^- , $recA^-$). Effektiviteten ved transduceringen er ca. 5000 ampicillinreistente kolonier pr. μ g pYcl vektor. 3000 amp^R kolonier udtages og dyrkes hver for sig i hullerne i mikrotiterplader i LB medium (10 g Bacto-Trypton (Difco), 5 g Bacto gærekstrakt (Difco), 10 g NaCl) indeholdende 100 μ g/ml ampicillin.

Eksempel 2.

Isolering af det regulerede sur phosphatase gen PHO5

Kopier af gen-samlingen dyrkes på LB agarplader (LB medium plus 15 g/l agar) indeholdende 100 μ g/ml ampicillin. Cellerne isoleres ved centrifugering (Sorvall, GSA rotor, 10 minutter ved 600 omdr./min., 4°C), resuspenderes i 100 ml TE (10 mM Tris.HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0) og centrifugeres atter under de ovenfor anførte betingelser. Cellematerialet resuspenderes i 3 ml Tsuc (50 mM Tris.HCl, pH 7,5, 25% (vægt/rumfang) saccharose) og overføres til SS-34 polypropylen Sorvall-rør. Alle de efterfølgende trin gennemføres på is:

0,3 ml lysozymopløsning (10 mg/ml, indkøbt fra Worthington,

- 11.000 enheder/mg) tilsættes. Efter 5 minutter tilsættes 1,2 ml EDTA (500 mM, pH 8,0), og efter yderligere 5 minutter tilsættes 4,8 ml detergent (0,1% "Triton X-100" (Merck), 50 mM EDTA, 50 mM Tris.HCl, pH 8,0). Efter 5 minutters for-
- 5 løb centrifugeres lysatet i en forafkølet SS-34 rotor i 40 minutter ved 4°C. Supernatanten fjernes omhyggeligt, og der tilsættes fast CsCl (8,3 g CsCl til 8,7 ml supernatant). Efter tilsætning af ethidiumbromid (Sigma) (slutkoncentration 1 mg/ml supernatant) overføres opløsningen til 13,5 ml quick
- 10 Seal polyallomer-rør (Beckman) og centrifugeres i en Beckman Ti50 rotor i 40 timer ved 40.000 omdr./min. To fluorescerende bånd kan gøres synlige med langbølget ultraviolet lys (366 nm). Det nederste bånd indeholder overspiralformet (super-
- 15 coiled) plasmid DNA, som opsamles ved at perforere røret fra siden med en 2 ml injektionssprøjte (18G nål). Ethidiumbromidet fjernes ved ekstraktion 5 gange med lige store rumfang isopropanol (mættet med CsCl), og produktet overføres til 30 ml Corex-rør. 2,5 rumfang TE tilsættes, og DNA'et fælles med ethanol. Opløsningen henstår derfor i 12-15 timer ved
- 20 -20°C. Det udfældede DNA opsamles ved centrifugering i en Sorvall HB-4 rotor i 30 minutter ved 12.000 omdr./min. ved 0°C og genopløses i 200 µl TE. 50-100 µg hybridplasmid DNA udvindes fra en 100 ml kultur.

- Plasmid DNA fra disse samlinger anvendes til at transformere
- 25 *S.cerevisiae* stamme AH216 (a, his3, leu3, pho3, pho5) under anvendelse af fremgangsmåden beskrevet af Hinnen et al. (1). Gærtransformanter kopieringsplatteres på lav P_i-minimal medium [som "Difco yeast minimal medium without amino acids" tilsat 20 g/l glucose, men fremstillet ud fra bestanddelene
- 30 i overensstemmelse med Difco's recept (Difco Manual, Difco Laboratories, Detroit, USA), idet der dog er anvendt 0,03 g/l KH₂PO₄ plus 1 g/l KCl i stedet for 1 g/l KH₂PO₄] og farves for sur phosphatase aktivitet ved overlejring med farvnings-
- 35 Fast Blue B Salt (Serva) og 0,2 mg/ml α-naphthylphosphat (Serva)]. Kolonier med et funktionelt PHO5 gen farver rødt ved ikke-undertrykning af genet på lav P_i-medium. Ved gen-

tagen opsamling (17) af gen-samlingen 3 fås selvstændige kloner, som udviser sur phosphatase aktivitet, der kan slukkes eller undertrykkes.

- En af disse kloner (pG7) underkastes yderligere analyse.
- 5 Hybridplasmidet har en størrelse på 42 kb. EcoRI og BamHI fragmenter af pG7 underklones i henholdsvis pBR322/HIS3 (16) og pJDB207 (28). Restriktionsnedbrydningerne gennemføres som anbefalet af leverandøren (New England Biolabs), og bindinger (ligations) udføres i 20 μ l med 150 enheder T4 DNA ligase
- 10 (New England Biolabs) og 20 μ g/ml af de enkelte nedbrudte plasmider (betingelser som foreslået af New England Biolabs). Et 5,1 kb BamHI fragment, som er en del af et 8 kb EcoRI fragment, underklones i gærvektor pJDB207, og efter transformation af gærstamme AH216 udløser dette hybridplasmid
- 15 (pJDB207/PHO5, PHO3, se fig. 1) høj phosphatase aktivitet under ikke-slukkede eller ikke-undertrykte (lav P_i -)betingelser (PHO5 gen) og lave aktivitetsniveauer i normal gær minimal medium (kopiering af PHO3 genet).

Eksempel 3.

20 Lokalisering af PHO5 genet og DNA sekvensanalyse

- Til lokalisering af PHO3 og PHO5 i BamHI fragmentet udnyttes mønsteret for Sau3A restriktionsteder og et enkelt PstI sted. Nedbrydning af BamHI fragmentet med restriktionsendonuklease Sau3A (New England Biolabs) danner 6 fragmenter (A-F, fig. 2).
- 25 Underkloning af et partielt Sau3A nedbrydningsprodukt til BamHI stedet i den selvkopierende gærvektor pJDB207 fører til plasmider med forskellige kombinationer af Sau3A fragmenter. Disse plasmider anvendes derefter til pho3, pho5 mutant gær *S.cerevisiae* AH216. Transformanterne kontrolleres for sur
- 30 phosphatase aktivitet efter dyrkning på enten lav P_i - eller normale minimal medium plader. Kloner indeholdende mindst Sau3A fragmenter A og B (fig. 2, nr. 1-4) kopierer sur phos-

phatase i samme mængde (kvalitative bedømmelser efter overlejring med sur phosphatase farvnings agar, som beskrevet i eksempel 2) som hele 5,1 kb BamHI fragmentet. Kopieringen reguleres sædvanligvis ved hjælp af koncentrationen af uorganisk fosfat i mediet. Kloner, som kun har Sau3A-fragment A (fig. 2, nr. 5, 6), kopierer lave koncentrationer af sur phosphatase, som ikke påvirkes af koncentrationen af uorganisk fosfat i mediet. Dette indikerer, at information, som bæres af Sau3A-fragment A, er tilstrækkelig til strukturel sur phosphatase (PHO3) kopiering. Sau3A-fragment B (fig. 2, nr. 7) alene fører ikke til nogen kopiering (expression) af sur phosphatase hverken under udslykkede eller ikke-udslykkede betingelser. En underklon med den fuldstændige sekvens mellem BamHI- og PstI-stederne (fig. 2, nr. 10) udviser reguleret, men ikke strukturel (konstitutive) syntese af sur phosphatase. Denne underklon må derfor indeholde PHO5 genet (16).

Den nøjagtige lokalisering af PHO5 genet bestemmes ved hjælp af DNA sekvensering under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Maxam og Gilbert (15). Et 623bp BamHI-SalI restriktionsfragment kloner i plasmid pBR322 (se fig. 1), under ombytning af BamHI-SalI fragmentet, som strækker sig fra stilling 375 til 650 (pBR322 nomenklatur), under anvendelse af nedbrydnings- og bindingsbetingelser som beskrevet ovenfor (alle enzymer er fra New England Biolabs). DNA-fragmenter fra det indsatte BamHI-SalI DNA mærkes asymmetrisk ved 5'-enderne på følgende steder: BamHI(-541), Sau3A(-200) og SalI(+82), (angående nummerering se fig. 3a). Nukleotidsekvensen for det indsatte 623bp BamHI-SalI DNA er vist i fig. 3a. Dette viser, at den indsatte del indeholder PHO5 promotor-området og dele af PHO5 phosphatase protein-kodningsområdet.

Eksempel 4.Dannelse af plasmid p30 (se fig. 4)a) Eliminering af BalI restriktionsstedet i plasmid pBR322

- 5 Skemaet vist i fig. 4 kræver eliminering af det entydige BalI restriktionssted i plasmid pBR322. 3 µg pBR322 nedbrydes fuldstændigt med restriktionsendonukleaserne BalI (BRL) og PvuII (Biolabs) i overensstemmelse med forskrifterne fra leverandøren. BalI/PvuII-dobbeltnedbrydningen af
- 10 pBR322 resulterer i to restriktionsfragmenter med en størrelse på 3738 bp og 622 bp. De to fragmenter adskilles på en lavtsmeltende agarose gel (sigma) i TBE (90 mM Tris.HCl pH 8,3, 2,5 mM EDTA, 90 mM borsyre)puffer. DNA båndene farves med ethidiumbromid og gøres synlige ved belysning med
- 15 langbølget ultraviolet lys ved 366 nm. Det stykke agarose, som indeholder 3738 bp fragmentet, udskæres fra gelen, bringes på væskeform ved 65°C, indstilles på 500 mM NaCl og inkuberes ved 65°C i 20 minutter. Der tilsættes 1 rumfang phenol (bragt i ligevægt med 10 mM Tris.HCl pH 7,5, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl). Den vandige fase genektraheres to gange med
- 20 phenol og én gang med chloroform. DNA'et fældes med 2,5 rumfang koldt absolut ethanol og opsamles ved centrifugering. DNA-massen vaskes med koldt 80%'s ethanol og tørres derpå i vakuum. DNA'et resuspenderes i TE i en koncentration på 0,15 mg/ml.
- 25 Det isolerede 3738 bp DNA-fragment har to såkaldte korte eller dobbeltstrengede ender som følge af dobbeltnedbrydninger-

ne med BalI og PvuII. DNA'et cycliseres ved sammenbinding af de dobbeltstrengede ender. 0,6 µg DNA inkuberes natten over ved stuetemperatur i 30 µl 60 mM Tris.HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 4mM ATP og 900 enheder T4 DNA-ligase (Bio-labs). 5 µl alikvoter af bindingsblandingen blandes med 50 µl calciumbehandlet, transformationskompetente Escherichia coli HB101 celler, fremstillet under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Mandel et al. (29). Blandingen holdes på is i 5 minutter, hvorefter den inkuberes i 2 minutter ved 37°C og henstår i 10 minutter ved stuetemperatur inden den anbringes LB agarplader indeholdende 100 µg/ml ampicillin. 6 amp^R kolonier udtages og dyrkes hver for sig i 100 ml LB-medium (som ovenfor, men uden agar) indeholdende 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA fremstilles ud fra cellerne under anvendelse af den i eksempel 2 beskrevne fremgangsmåde. Restriktionsnedbrydninger med HaeIII (fra Biolabs, nedbrydningsbetingelser som anbefalet af leverandøren), PvuII og BalI af plasmiderne analyseres på en 1,5% agarose-gel i TBE puffer. Restriktionsmønsteret og den beregnede størrelse af det nyligt dannede samlingsfragment indicerer, at plasmiderne er identiske og indeholder alle pBR322 sekvenserne bortset fra BalI-PvuII fragmentet. Disse plasmider mangler BalI restriktionsstedet og betegnes derfor som pBR322ΔBalI.

25 b) Kloning af et gær 5,1 kb BamHI restriktionsfragment indeholdende PHO5 og PHO3 i pBR322 BalI

pJDB207/PHO5,PHO3 (se fig. 1) indeholder en gær 5,1 BamHI indsætningsdel med generne for reguleret og strukturmæssig gær sur phosphatase (PHO5 og PHO3). pJDB207/PHO5,PHO3 samt plasmid pBR322ΔBalI nedbrydes med restriktionsendonuklease BamHI. Efter fuldstændig nedbrydning inaktiveres enzymet i 2 minutter ved 65°C. Begge DNA'er fældes med ethanol og resuspenderes i 10 mM Tris.HCl pH 8,0 ved en koncentration på 0,2 mg/ml. 0,5 µg af de to BamHI-nedbrudte DNA'er kombineres og bindes i 20 µl bindingspuffer (som anbefalet af New England Biolabs) indeholdende 300 enheder T4 DNA ligase i 20 ti-

mer ved 15°C. 5 µl alikvoter af bindingsblandingen sættes til 50 µl calciumbehandlet E.coli HB101 celler, og transformeringen gennemføres på samme måde som beskrevet i eksempel 4a. De transformerede Escherichia coli celler testes for resistens mod ampicillin og tetracyclin. 8 amp^R, tet^S kolonier isoleres og dyrkes i 100 ml LB medium indeholder 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA isoleres fra cellerne (se eksempel 2). Restriktionsnedbrydninger med BamHI viser, at 4 plasmider indeholder en 5,1 kb indsat del foruden 10 3,7 kb vektorfragmentet (pBR322ΔBamI). Restriktionsnedbrydninger med SalI (New England Biolabs) fastlægger orienteringen af det indsatte 5,1 kb fragment: 2 plasmider har den indsatte del orienteret som vist i fig. 4. Et af disse betegnes som p30. Transskriptionsretningen i PHO5, PHO3 generne i 5,1 kb indsætningsdelen er mod uret som vist i fig. 4. 15

Eksempel 5.

Indsætning af fremmed DNA i p30 (se fig. 4)

a) Isolering af et 3,9 kb EcoRI-BamI fragment af p30 (fragment A)

10 µg p30 DNA nedbrydes med restriktionsendonuklease BamI. 20 Efter ekstraktion med phenol/chloroform fældes DNA'et med ethanol. DNA'et resuspenderes i 100 µl TE puffer. Restriktionsfragmenterne adskilles på en præparativ 0,8% lavt smeltende agarose-gel (Sigma). Et 5,1 kb fragment indeholdende vektordelen af p30 elueres fra gelen på samme måde som beskrevet i eksempel 4a. DNA'et renses ved adsorption af DNA'et 25 på en DE52 (Whatman) ionbyttersøjle i en puffer med lavt saltindhold (150 mM NaCl, 19 mM Tris.HCl pH 8,0, 1 mM EDTA) og efterfølgende eluering med en pufferopløsning med stort saltindhold (1,5 M NaCl, 10 mM Tris.HCl pH 8,0 og 1 mM EDTA). 30 DNA'et fældes med ethanol, hvorefter det yderligere nedbrydes med EcoRI (Boehringer). 3,9 kb EcoRI-BamI restriktionsfragmentet adskilles igen på en præparativ 0,8% lavt smeltende agarose-gel, genvindes som beskrevet i eksempel 4a og fældes med ethanol. Dette DNA-fragment kaldes fragment A.

eksempel 4a)). Blanderne anbringes på LB agarplåder tilsat 100 µg/ml ampicillin. Pladerne inkuberes ved 37°C i 16 timer. Der fremstilles ca. 300 ampicillinresistente kolonier af *Escherichia coli* HB101. Plasmid DNA fra 8 ampicillinresistente kolonier isoleres, analyseres, og deres struktur bestemmes ved sammeligning af bevægeligheden af restriktionsfragmenterne fremkommet efter spaltning med EcoRI og HaeIII med standard DNA [bakteriofag λ DNA nedbrudt med HindIII (New England Biolabs), p30 plasmid DNA nedbrudt med HaeIII og EcoRI]. Efter verificering af strukturen af samlingerne fås 5 plasmider, som har den korrekte struktur. Et af disse plasmider, som indeholder PHO5 promotoren bundet til 8₁'-interferon-polypeptidkodningsområdet (se fig. 5) kaldes p30IFN1(8₁').

Eksempel 6.

15 Addition af kopieringsområde og selektiv markør for gær (se fig. 4)

a) Isolering af et 1,5 kb EcoRI fragment fra plasmid Yrp7 og binding deraf til plasmid p30IFN1(8₁')

For at lette bindingsreaktionen renses 1,5 kb EcoRI restriktionsfragmentet. Plasmid Yrp7 (4) spaltes med EcoRI, de to fremkomne fragmenter adskilles på en 0,8% agarose-gel, og 1,5 kb fragmentet, som indeholder et autonomt kopierende gærsegment, og gær TRP1-genet renses og isoleres under anvendelse af den i eksempel 4a) beskrevne fremgangsmåde. Der foretages binding (som anbefalet af New England Biolabs) med 20 µg/ml EcoRI "cut" p30IFN1(8₁') og 10 µg/ml af 1,5 kb EcoRI restriktionsfragmentet fra Yrp7, idet der anvendes 100 enheder T4 ligase.

30 b) Transformerings af *Escherichia coli* JA 194 med de bundne fragmenter

Plasmider indeholder TRP1 gær-genet kan direkte selekteres ved transformation af *Escherichia coli* trpC mutantstamme JA 194

- (trpC, leuB, B1). *Escherichia coli* trpC genet koder for *Escherichia coli* N-(5'-phosphoribosyl)-anthranilat-isomerase. *Escherichia coli* trpC mutanter kan komplementeres med gær TRP1 genet (4). Transformerings af *Escherichia coli* stamme JA 194
- 5 gennemføres på samme måde som beskrevet for *Escherichia coli* HB101 (se eksempel 4a)) med følgende ændring: inden anbringelse af blandingerne på agarplader henstilles cellerne i 1 ml LB medium ved 37°C i 60 minutter, cellerne vaskes én gang med *Escherichia coli* M9 minimal medium (30) og anbringes på
- 10 M9 minimal mediumplader tilsat vitamin B1 (1 µg/ml) og L-leucin (20 mg/ml). Pladerne inkuberes i 2 dage ved 37°C. Der udvindes ca. 1000 tryptophan prototrofe *Escherichia coli* kolonier.

c) Isolering og karakterisering af hybrid plasmider

- 15 Trp⁺ kolonier renses på LB plader tilsat 100 µg/ml ampicillin. De enkelte kolonier udtages, og plasmiderne isoleres under anvendelse af den i eksempel 2 beskrevne fremgangsmåde. Rensede plasmider analyseres ved bestemmelsen af størrelsen af restriktionsfragmenterne dannet efter spaltning med EcoRI,
- 20 HindIII, PstI og BglII (Biolabs). Der fås to forskellige typer plasmider, som indeholder 1,5 kb EcoRI restriktionsfragmentet i de to mulige orienteringer (se fig. 4). De kaldes p30IFN2(8₁') og p30IFN2'(8₁') som angivet i fig. 4.

Eksempel 7.

- 25 Transformerings af *Saccharomyces cerevisiae* RH971 og inducering af interferon-produktionen

Plasmider p30IFN2(8₁') og p30IFN2'(8₁') indføres hver for sig i *Saccharomyces cerevisiae* stamme RH971 (a, trp1, leu2, his4) på samme måde som beskrevet af Hinnen et al. (1). 1 µg plasmid

30 DNA sættes til 100 µl af en sfæroplastsuspension, og blandingen behandles med polyethylenglycol som beskrevet (1). Sfæroplaster blandes med 10 ml regenereringsagar og anbringes på plader med gær-minimal-medium uden leucin. Efter inkubering

i 3 dage ved 30°C fås ca. 1000 transformerede celler.

En enkelt gær-koloni fra gær-transformationspladerne [betegnet henholdsvis *Saccharomyces cerevisiae* RH971/p30IFN2(8₁') og /p30IFN2'(8₁')] udtages og anbringes i 10 ml gær-minimal-medium i en 100 ml Erlenmeyer-kolbe og dyrkes ved 30°C og 200 omdr./min. i 24 timer til en tæthed på ca. $2-3 \times 10^7$ celler/ml. Cellerne vaskes en gang med 20 ml lav-P_i minimal-medium. 3 ml af de resuspenderede celler anvendes til inokulering af henholdsvis 300 ml lav-P_i minimal-medium og 300 ml normal minimal-medium i 1000 ml Erlenmeyer-kolber. Inkuberingen gennemføres ved 30°C og 160 omdr./min. Induceringen af PHO5 promotoren følges ved at måle forekomsten af sur phosphatase aktivitet i hele celler som beskrevet af Toh-e et al. (31). Cellerne dyrkes til ca. $1-2 \times 10^7$ celler/ml (26-30 timers inkubering).

15

Eksempel 8.

Fremstilling af gærcelleekstrakter og bestemmelse af interferon indholdet.

Celler fra 300 ml dyrkningsmediet (se eksempel 7) med en tæthed på $1-2 \times 10^7$ /ml isoleres ved centrifugering i en Sorvall GSA rotor i 5 minutter ved 8000 omdr./min. ved 4°C. Cellerne vaskes én gang med 100 ml vand, resuspenderes i 6 ml iskold lyseringsblanding [0,1 M kaliumphosphatpuffer pH 7,4, 1% (rumfang/rumfang) Triton X-100, 0,0001M PMSF (Merck)] og overføres til et 30 ml corex rør. Suspensionen centrifugeres atter i 5 minutter i en Sorvall SS-34 rotor ved 8000 omdrejninger ved 4°C, hvorefter der foretages resuspendering i 3 ml lyseringsblanding ved 0°C. 4 g glasperler (0,4 mm i diameter) sættes til cellerne, og suspensionen rystes på et hvirvelblandeapparat (Scientific Instruments Inc., USA) med fuld hastighed i 30 sekunder, hvorefter der afkøles i 1 minut i et isbad. Denne rystningsprocedure gentages 5-10 gange, indtil mere end 90% af cellerne er lukket op (kontrol under lysmikroskop). Cellerester og glasperler fjernes fra opløsningen ved centrifugering i 10 minutter ved 8000 omdr./min. ved 4°C i en Sorvall

HB-4 rotor. Supernatanten overføres til Eppendorf-rør, fryses i flydende nitrogen og opbevares ved -60°C . Interferonaktiviteten bestemmes under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Armstrong (32) og under anvendelse af CCL-23 celler og vesiculær stomatitis virus (VSV) som udfordrer virus. Resultaterne er anført i nedenstående tabel 1.

Tabel 1

Interferonaktivitet i *Saccharomyces cerevisiae* stamme RH971 efter transformation med rekombinant plasmiderne henholdsvis p30IFN2'(8₁') og p30IFN2'(8₁') og tillige med plasmid pJDB207/IFN2'(8₁') (se eksempel 9).

	Plasmid	Interferonaktivitet udtryk i enh./ml gærcelleekstrakt		
		p30IFN2'(8 ₁ ')	p30IFN2'(8 ₁ ')	pJDB207/IFN2'(8 ₁ ')
15	slukkede betingelser (normalt phosphatindhold)	0	30	100
20	ikke-slukkede betingelser (lavt phosphatindhold)	700	7000	50000

Eksempel 9.

Indsættelse af interferon-genet i højkopierings-gær 2μ vektoren pJDB 207 (se fig. 6)

Plasmid p30IFN2'(8₁') nedbrydes med restriktionsendonukleaserne HindIII og BamHI under anvendelse af leverandørens specifikationer (Biolabs). Der dannes to fragmenter med størrelsen 4,0 kb og 2,0 kb. 2,0 kb restriktionsfragmentet isoleres og renses ved elektroforese på lavt smeltende agarose-gel som beskrevet under trin 4a).

Plasmid pJDB207 (28) nedbrydes med restriktionsendonukleaserne HindIII og BamHI. Der dannes tre fragmenter. 6,5 kb restriktionsfragmentet adskilles på samme måde som beskrevet ovenfor.

- 5 0,3 g af 2,0 kb fragmentet (indeholdende PHO5 promotoren bundet til interferon-protein-kodningsområdet) bindes i 15 timer til 6,5 kb vektorfragmentet i et samlet rumfang på 20 µl under anvendelse af 300 enheder T4 DNA ligase under de af leverandøren (Biolabs) foreskrevne betingelser. *Escherichia coli*
- 10 HB101 celler transformeres, og ampicillinresistente kolonier udvælges. Plasmid DNA'et isoleres, og den korrekte struktur af det isolerede plasmid DNA verificeres ved restriktionsnedbrydninger under anvendelse af HindIII og BamHI med p30IFN2'(8₁') og pJDB207 nedbrudt med de samme enzymer som molekylvægtstandarder. Det dannede nye plasmid betegnes pJDB207/IFN2'(8₁').
- 15

- Plasmid pJDB207/IFN2'(8₁') transformeres til *Saccharomyces cerevisiae* stamme RH971 på samme måde som beskrevet (1) under udvælgelse af leucinprototrofe kolonier. En enkelt leucinprototrof gærkoloni [betegnes *Saccharomyces cerevisiae* RH971/pJDB207/IFN2'(8₁')] udtages og dyrkes på samme måde som beskrevet i eksempel 7. Interferonindholdet bestemmes på samme måde som beskrevet i eksempel 8. Resultaterne er anført i tabel 1.
- 20

Eksempel 10.

- 25 Fremstilling af *Escherichia coli* stammer transformeret med rekombinant plasmider indeholdende kodningsområderne for humane lymfoblastoide interferoner

A. Isolering af poly(A) RNA beriget med HuIFN mRNA (fig. 7)

a) Inducering af Namalwaceller

- 30 Namalwaceller dyrkes i dyrkningsmediet RPMI 1640 indeholdende 10% 's fetal kalveserum ved 37°C. Når der er nået en celletæt-

hed på 3×10^6 celler/ml, centrifugeres suspensionen ved 800 G i 10 minutter ved stuetemperatur. De isolerede celler resuspenderes i 200 ml dyrkningsmedium indeholdende glutamin (0.027 rumfangsprocent), penicillin (200 enheder/ml) og streptomycin (50 g/ml). Cellerne inkuberes i 90 minutter ved 37°C med Newcastle disease virus (NDV 110) ved et forhold på 190 HAU/ 10^6 celler (HAU: hæmagglutinationsenheder). Ved til-sætning af frisk dyrkningsmedium indstilles celletætheden på $1,3 \times 10^6$ celler/ml, og cellesuspensionen rystes ved 34°C med 100 omdr./min. Efter 12 timers forløb isoleres 6×10^9 celler, som resuspenderes i 50 ml phosphatpufret saltopløsning ("PBS", 1 liter PBS indeholder 80 g NaCl, 2 g KCl, 14,4 g Na_2HPO_4 og 2 g KH_2PO_4). Inden cellerne isoleres, udtages en prøve, og interferonaktiviteten bestemmes i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge Armstrong (32) under anvendelse af humane CCL-23 celler og vesiculær stomatitis virus (VSV) som challenger virus. Interferonaktiviteten bestemmes til 4300 IFN enheder/ml.

b) Sprængning af cellerne og deproteinisering

20 Cellesuspensionen (6×10^9 celler i 50 ml PBS) sættes ved stuetemperatur til 800 ml lyseringspuffer bestående af 0,05 M Tris.HCl (pH 7,5), 0,1 M NaCl, 5 mM EDTA og 2% SDS (krystallinsk research kvalitet, Serva). Lysatet nedbrydes med 0,2 mg/ml præinkuberet (2 timer ved 37°C) protease (Protease P, type VI, Sigma) ved stuetemperatur i 1 timer under omrøring af opløsningen. Opløsningen deproteiniseret ved ekstraktion med 3 gange 500 ml phenol mættet med TNE og med 5 gange 500 ml chloroform. Der fås 500 ml nukleinsyrer bestemt ved absorbansen ved 260 nm.

c) Fjernelse af kontaminerende DNA og RNA

30 Den let viskose vandige opløsning fremstillet som beskrevet ovenfor (trin Ab) indstilles på 0,3 M NaCl, og der tilsættes 1 g oligo(dT)-cellulose (type 7, P-L Biochemicals). Efter omrøring i 30 minutter ved stuetemperatur centrifugeres suspensionen i 1 liter Sorvall flasker i en Sorvall RC-3 centrifuge ved 4000 omdr./min. i 10 minutter ved stuetemperatur, og

oligo(dT) celluloseopslæmning vaskes to gange med 40 ml 2 gange TNE indeholdende 0,5% SDS. Det bundne poly(A) RNA elueres derpå ved vaskning med 5 gange 2,5 ml H₂O. Udbyttet er 720 µg poly(A) RNA, hvilket bestemmes ved måling af den optiske tæthed. Supernatant RNA-opløsningen fra den første adsorption adsorberes endnu en gang på 1 g oligo (dT) cellulose, og der elueres som beskrevet ovenfor, hvorved der fås 320 µg poly(A) RNA. Eluaterne hældes sammen, indstilles til TNE, og poly(A) RNA'et fældes med 67% ethanol ved -20°C i 10 timer. RNA'et isoleres ved centrifugering med 10.000 omdr./min. i en Sorwall RC-5B centrifuge i 10 minutter ved 0°C. Bundfaldet (1 mg) genopløses i 1 ml 1 mM EDTA.

RNA'et analyseres for HuIFN mRNA aktivitet ved injektion i oocytter fra *Xenopus laevis* på følgende måde:

50 nl af RNA-opløsningen injiceres til hver enkelt af en gruppe på 20 oocytter. Oocysterne inkuberes i Barth-medium (2 mM Tris, 88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0,33 mM Ca(NO₃)₂·H₂O, 0,41 mM CaCl₂·2H₂O, 0,82 mM MgSO₄·7H₂O, 2,4 mM NaHCO₃, 0,01 mg/ml penicillin, 0,01 mg/ml streptomycin, idet opløsningen er indstillet på pH-værdien 7,6 med HCl) i overensstemmelse med Gurdon (33), Barth (34) og Colman et al. (35). De injicerede oocytter inkuberes i 42-48 timer, og inkubationsmediet udtages, centrifugeres i 5 minutter i en Eppendorf-centrifuge, og supernatanten anbringes ved -20°C eller -80°C, indtil den skal anvendes til analysen. IFN-aktiviteten bestemmes i alt væsentligt i ved den fremgangsmåden ifølge Armstrong (32), idet der dog anvendes VSV som challenger virus på Hep-2-celler (Flow Laboratories). Oocytekstrakten har en specifik aktivitet på 600 IE interferon pr. µg RNA injiceret.

d) Berigelse af poly(A) RNA'et med HuIFN mRNA

Poly(A) RNA'et ledes gennem en Chelex-100-søjle (200-400 mesh, Bio-Rad) med et lejerumfang på 0,5 ml. Søjlen skylles med 1 ml 1 mM EDTA.

Eluatet (1 mg poly(A) RNA i 2 ml EDTA) opvarmes i 2 minutter til 100°C og underkastes centrifugering gennem en saccharose-densitets gradient (6 portioner 14 ml saccharoseopløsning med en saccharosekoncentration, der stiger fra 5 til 23% (m/v) og indeholder 50 mM Tris.HCl (pH-værdi 7,5), 0,2 M NaCl og 1 mM EDTA). Centrifugeringen gennemføres i en TST 41-rotor (Kontron AG) med 35.000 omdr./min. i 16 timer ved 5°C. Der opsamles 0,3 ml fraktioner med en ISCO gradient-opsamler. Til hver fraktion sættes 2 rumfang ethanol, og opløsningen henstår i 10 timer ved -20°C. Det udfældede mRNA fracentrifugeres (Sorvall, HB-4 rotor ved 0°C, 10.000 omdr./min. i 10 minutter). Bundfaldet fra hver fraktion genopløses i 25 1 1 mM EDTA, og hver fraktion testes for human IFN mRNA-aktivitet som beskrevet ovenfor (trin Ac), idet der kun injiceres 10 oocyter pr. RNA-prøve i stedet for 20. Resultaterne er anført i den efterfølgende tabel 2.

Tabel 2

HuIFN mRNA aktivitet for fraktioner af saccharose-densitets gradient.

	Fraktion nr.	IFN aktivitet (enh./ml)
5	1-18	-
	19	162
	20	162
	21	162
	22	162
10	23	ikke testet
	24	729
	25	ikke testet
	26	405
	27	ikke testet
15	28	486
	29	ikke testet
	30	162
	31	ikke testet
	32	162
20	33	ikke testet
	34	54
	35-40	ikke testet

Fraktionerne 23-29 hældes samme, og poly(A) RNA'et renses yderligere på følgende måde:

- 25 Poly(A) RNA opløsningen indstilles til 2 x TNE i 0,5% SDS og sættes til en 200 µl oligo(dT) celledulosesøjle. Søjlen vaskes med 2 ml 2 x TNE i 0,5% SDS, og poly(A) RNA'et elueres ved vaskning med 5 gange 0,5 ml H₂O. Eluatet indstilles til TNE, og opløsningen ekstraheres 2 gange med et lige så stort rumfang phenol (mættet med TNE) og 2 gange med et lige så stort rumfang chloroform. Poly(A) RNA'et fældes med 2 rumfang ethanol ved -20°C i 10 timer og isoleres ved centrifugering i en HB-4-rotor som beskrevet ovenfor.

Poly(A) RNA'et opløses i 100 μ l 0,5 mM EDTA. Udbyttet er 40 μ g bestemt ved måling af den optiske tæthed.

En prøve af poly(A) RNA'et analyseres for human IFN-aktivitet som beskrevet ovenfor under anvendelse af 20 oocyter pr. analyse. Poly(A) RNA præparatet har en specifik aktivitet på 8100 IE interferon pr. μ g RNA.

B. Fremstilling af dobbeltkædet cDNA (fig. 7)

Poly(A) RNA beriget med HuIFN mRNA (jfr. trin Ad) anvendes som skabelon til fremstilling af dobbeltkædet cDNA i alt væsentligt som beskrevet af Efstratiadis et al. (36), Maniatis et al. (37) og Hoeijmakers et al. (38).

a) Syntese af første kæde

250 μ l reaktionsblanding indeholdende 40 mM Tris.HCl (pH 7,5), 30 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 0,5 mM DTT (Calbiochem.), 1 mM dGTP, dCTP, dTTP (P-L Biochemicals) og 1 mM ^{32}P -dATP (Amersham, specifik aktivitet 50.000 cpm/nmol), 20 μ g/ml oligo(dT)₁₂₋₁₈ (P-L Biochemicals), 40 μ g/ml poly(A) RNA og 100 enheder aviært myeloblastosis virus (AMV) revers-transskriptase (Life Sciences, Inc., St. Petersburg, Florida) inkuberes i 80 minutter ved 37°C. Reaktionen afbrydes ved at indstille opløsningen på 10 mM EDTA og 0,1% SDS. Blandingen ekstraheres en gang med 1 rumfang phenol. Den vandige fase reekstraheres med 1 rumfang chloroform og sættes til en kolonne med 3 ml Sephadex G-50 (Pharmacia, fine). Der udtages fraktioner på 0,1 ml. Radioaktiviteten af hver fraktion bestemmes ved måling af Cerenkov-strålingen. Radioaktive fraktioner hældes sammen, og nukleinsyrerne fældes med 2 rumfang ethanol ved -20°C i 10 timer. Prøven centrifugeres i en HB-4-rotor i 20 minutter ved 10.000 omdr./min. ved 0°C. Bundfaldet opløses i 95 μ l H₂O. 5 μ l 10 N NaOH tilsættes, og blandingen inkuberes ved 25°C i 40 minutter. Efter neutralisering med 5 M eddikesyre tilsættes 50 μ l vand og 2 rumfang ethanol, og prøven henstår ved -20°C i 10 timer. Bundfaldet isoleres ved centrifugering som beskrevet ovenfor og genopløses i 200 μ l 0,1 mM EDTA. Udbyttet af enkeltkædet cDNA er 3,7 μ g. Størrelsen af cDNA'et

er 700-1.500 nukleotider i længden, bestemt ud fra dets elektroforetiske mobilitet i en 6% polyacrylamidgel i Tris-borat-EDTA (108 g Tris, 9,3 g dinatrium EDTA og 55 g borsyre pr. liter opløsning med pH-værdi 8,3) indeholdende
5 7 M urinstof, i forhold til markør DNA'er af kendt længde (39).

b) Syntese af anden kæde og S_1 -endonukleasenedbrydning

Den dannede cDNA-opløsning opvarmes til 100°C i 90 sekunder, lynafkøles og inkuberes i en 400 µl reaktionsblanding indeholdende 0,1 M kaliumphosphatpuffer (pH-værdi 6,9),
10 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT (Calbiochem), 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dTTP (P-L, Biochemicals), 1 mM 3H -dGTP (Amersham, specifik aktivitet 94.000 cpm/nmol) og 165 enheder/ml E.coli DNA polymerase I (Biolabs, New England) i 8 timer
15 ved 15°C. Reaktionen afsluttes ved tilsætning af EDTA og SDS til slutkoncentrationer på henholdsvis 10 mM og 0,1%. Blandingen ekstraheres med phenol og chloroform, kromatograferes over Sephadex G-50 (Pharmacia, fine, 2 ml lejerumfang) og fældes med ethanol som beskrevet ovenfor (trin
20 Ba).

Det dannede DNA behandles i en 50 µl inkuberingsblanding indeholdende 0,25 M NaCl, 50 mM natriumacetat (pH-værdi 4,5) og 1 mM $ZnSO_4$ med 6 enheder S_1 -endonuklease (P-L Biochemicals) ved 37°C i 30 minutter. Reaktionen afbrydes med
25 0,1% SDS og 10 mM EDTA. Reaktionsblandingen deproteiniseres med 1 rumfang phenol (mættet i 50 mM natriumacetat, pH-værdi 4,5) og chloroform. Den vandige fase kromatograferes på en søjle med 2 ml Sephadex G-50 (Pharmacia, fine) i TNE. Der opsamles fraktioner på 100 µl, og Cerenkov-strålingen bestemmes for hver enkelt fraktion. De udelukkede
30 fraktioner hældes sammen, og DNA'et fældes med 2 rumfang ethanol ved -20°C i 10 timer som beskrevet ovenfor. Bundfaldet centrifugeres i en HB-4-rotor (se ovenfor), og det isolerede bundfald opløses i 100 µl opløsning indeholdende
35 10 mM Tris.HCl (pH-værdi 7,5) og 0,5 mM EDTA. Der fås 4 µg DNA.

DNA'et fraktioneres gennem en saccharose-densitetsgradient (5-23%) i 50 mM Tris.HCl (pH-værdi 7,5) og 1 mM EDTA i en TST-60-rotor (Kontron AG). Centrifugeringen gennemføres ved 55.000 omdr./min. i 5 timer ved 15°C. Den DNA-fraktion, som aflejres hurtigere end et 800 basepar markør DNA, som kører i en parallelgradient, hældes sammen, indstilles til TNE og fældes med 67% ethanol ved -20°C i 10 timer. Der fås 0,4 µg dobbeltkædet cDNA.

C. Fremstilling af pBR 322-bundet cDNA (fig. 7)

10 a) Fremstilling af dCMP-forlænget cDNA

3'-enderne i 0,1 µg af det fremstillede ds cDNA forsynes med poly(dC)-haler i et reaktionsmedium på 10 µl indeholdende 100 mM natriumcacodylat (pH-værdi 7,2), 2,5 mM CoCl₂, 50 µg BSA (Calbiochem.) pr. ml, 1 mM dCTP og 10 enheder terminal-deoxynukleotidyltransferase (P-L Biochemicals) pr. µg ds cDNA. Efter inkubering (20 minutter ved 27°C), tilsættes EDTA til 10 mM, og prøven henstår ved -20°C til senere anvendelse.

b) Fremstilling af Pst I-spaltet, dGMP-forlænget pBR 322

20 10 µg pBR 322 plasmid-DNA spaltes med 10 enheder Pst I endonuklease (Biolabs) i en 100 µl opløsning indeholdende 50 mM NaCl, 6 mM Tris.HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 6 mM 2-mercaptoethanol og 100 µg/ml gelatine i 1 time ved 37°C. Opløsningen ekstraheres med 1 rumfang phenol og chloroform.

25 Opløsningen indstilles til TNE, og det lineariserede DNA fældes med 2 rumfang ethanol ved -20°C i 5 timer.

Det lineariserede plasmid-DNA forlænges med dGMP i en 200 µl reaktionsblanding indeholdende 100 mM natriumcacodylat (pH 7,2), 5 mM MgCl₂, 20 mM NaH₂PO₄, 50 µg BSA pr. ml, 1 mM dGTP og 100 enheder terminal-deoxynukleotidyltransferase (P-L Biochemicals). Efter inkubering i 20 minutter ved 37°C tilsættes EDTA til 10 mM, og reaktionsblandingen fryses ved -20°C til senere anvendelse.

c) Annelering af dGMP-forlænget pBR 322 til dCMP-forlænget ds cDNA

En blanding af dCMP-forlænget dobbeltpkædet cDNA (0,1 µg) og lineariseret pBR 322 med dGMP-haler (0,5 µg) i 500 µl
 5 TNE-puffer inkuberes ved 65°C i 1 time, ved 46°C i 1 time, ved 37°C i 1 time og ved 20°C i 1 time. Opløsningen indeholdende pBR 322-bundet cDNA sættes på is og anvendes straks til transformeringen.

10 D. Transformerung af Escherichia coli HB 101 med det annelerede hybridplasmid

Calciumbehandlet Escherichia coli HB 101 forberedes til transformeringen ved anvendelse af fremgangsmåden ifølge Mandel et al. (29).

10 µl reaktionsblanding indeholdende de annelerede pBR 322
 15 hybridplasmid DNA'er fremstillet som beskrevet ovenfor (trin Cc) sættes til en blanding indeholdende 150 µl calciumbehandlet Escherichia coli HB 101 i 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ og 10 mM Tris.HCl (pH-værdi 7,5) i et samlet rumfang på 200 µl.

20 Blandingen afkøles i is i 20 minutter, opvarmes til 42°C i 1 minut og inkuberes ved 20°C i 10 minutter. Der tilsættes 1 ml tryptonmedium (tryptonmediet indeholder 10 g Bacto-Trypton (Difco), 1 g gærekstrakt (Difco), 1 g glucose, 8 g NaCl og 294 mg CaCl₂·2·H₂O i 1 liter destilleret vand),
 25 og blandingen inkuberes i 30 minutter ved 37°C ved rystning med 300 omdr./min. Blandingen udhældes på to agarplader (McConkey agar, Difco, 0,6 ml/plade) tilsat 10 µg/ml tetracyclin (Sigma). Pladerne inkuberes ved 37°C i 12-17 timer. Der fås ca. 5.600 tetracyclinresistente kolonier
 30 af transformeret Escherichia coli HB 101.

E. Identificering af kloner indeholdende HuIFN cDNA

a) Syntese af en 13-mer oligodeoxynukleotidprimer (fig. 8)

Et oligodeoxynukleotid, som er komplementært til et stræk (stretch) på 13 nukleotider, som er fælles for både HuIFN-
 35 α₁- og HuIFN-β-mRNA, fremstilles kemisk ved anvendelse af

- phosphotriestermetoden (jfr. Itakura et al. (40), de Rooij et al. (41)). De enkelte trin i syntesemetoden er vist i fig. 8. Udgangsmaterialerne angivet i linie 1 i fig. 8 (mono- og dideoxynukleotider med beskyttelsesgrupper) er
- 5 kendt fra litteraturen. Beskyttelsesgrupperne fraspaltes ved anvendelse af fremgangsmåderne beskrevet af Itakura et al.: Deblokeringen af 5'-monomethoxytrityl (M)- eller -dimethoxytrityl (D)-substituerede hydroxylgrupper gennemføres med eddikesyre (80%'s) ved stuetemperatur, og β -cyano-
- 10 ethylphosphatgrupperne spaltes med 0,1 N natriumhydroxid i en blanding af dioxan og vand (4:1) ved stuetemperatur. Kondensationen af byggestenene gennemføres ved anvendelse af triisopropylbenzensulfonylchlorid som aktiveringsmiddel til dannelse af oligodeoxynukleotider op til den helt
- 15 beskyttede 13-mere primer anført i linie 7 i fig. 8. Det sidste trin (fuldstændig fjernelse af alle beskyttelsesgrupper) gennemføres på følgende måde:

- En opløsning indeholdende 64,6 mg af det helt beskyttede 13-mere oligodeoxynukleotid i 3 ml dioxan og 1 ml acetonitril
- 20 behandles med 200 mg syn-p-nitrobenzaldoxim og 124 mg N^1, N^1, N^3, N^3 -tetramethylguanidin, og blandingen henstår i 27 timer. Der tilsættes 10 ml ammoniak (25%'s), og opløsningen henstår i 24 timer ved 50°C. Efter fordampning af opløsningsmidlet i vakuum opløses remanensen i vand, indstilles
- 25 på pH-værdien 4 med eddikesyre, og opløsningen ekstraheres 20 gange med chloroform. Den vandige opløsning indampes i vakuum, og remanensen opløses i 1 ml eddikesyre (80%'s). Opløsningen henstår i 1 time, fortyndes med 6 ml vand, ekstraheres 3 gange med chloroform og lyofiliseres.
- 30 Den tredje del af det dannede råprodukt renses ved kromatografi på DEAE-Sephadex A 25 (søjlestørrelse: 10x1,3 cm) gennem en 200 ml 0,2-1,2 M triethylammoniumhydrogencarbonat-gradient. Eluering af hovedfraktionen forløber ved en gradientkoncentration på 0,87 M. Hovedfraktionen, der består
- 35 af det rene produkt, hvilket konstateres ved en HPLC-analyse, fordampes tre gange med vand, filtreres gennem 10 ml Dowex 50 W (NH_4 -salt) og lyofiliseres. HPLC (permafase AAX,

søjlestørrelse 90x0,3 cm, 60°C, 2 ml/min., gradient:
 A = 0,005 M KH₂PO₄, B = 0,5 M KH₂PO₄, 0,5 M KCl, pH 4,5,
 20% A → 100% B på 30 min.): t_R 11,8 min.

- b) Fremstilling af en ³²P-mærket human IFN-α- og IFN-β-specifik cDNA-sporingsdel (fig. 9)
- 40 pmol af den syntetiske 13-mere oligodeoxynukleotidprimer (jfr. trin Ea) og 40 pmol [γ-³²P]-ATP (5.700 Ci.mmol⁻¹, Amersham) kombineres i 100 µl 50 mM Tris.HCl (pH 9,5), 10 mM MgCl₂ og 5 mM DTT. Der tilsættes 50 enheder T₄-poly-nukleotidkinase (P-L Biochemicals), og efter 30 minutters forløb ved 37°C tilsættes yderligere 20 enheder af enzymet, hvorefter inkuberingen fortsættes i yderligere 15 minutter ved 37°C. Den vandige opløsning indeholdende den ³²P-mærkede primer renses ved ekstraktion med phenol. Yderligere rensning opnås ved kromatografi på en 4 ml Sephadex G-50 (Pharmacia, fine)-søjle i 1 mM Tris.HCl (pH 8,0). Der opsamles fraktioner på 0,1 ml. Radioaktiviteten for hver fraktion bestemmes ved måling af Cerenkov-strålingen. Der opnås en specifik aktivitet på 4.10⁶ Cerenkov cpm pr. pmol oligodeoxynukleotid. Den ³²P-mærkede primer (40 pmol) lyofiliseres, resuspenderes i 91 µl H₂O indeholdende 14 µg poly(A) RNA (fra inducerede Namalwaceller, fremstillet som beskrevet i trin A) og opvarmes i 60 sekunder til 100°C. Der tilsættes 9 µl 4 M KCl, og blandingen inkuberes ved 25°C i 60 minutter. Der tilsættes 450 µl reverstransskriptaseblanding, således at reaktionsrumfanget indeholder 40 mM Tris.HCl (pH 8), 4 mM MgCl₂, 1 mM DTT (Calbiochem, Inc.), 74 mM KCl, 1 mM af dATP, dGTP, dCTP og dTTP (P-L Biochemicals) og 90 enheder aviært myeloblastosisvirus (AMV)-reverstransskriptase. Inkubationen fortsættes i 1 time ved 37°C. Opløsningen ekstraheres med 1 rumfang phenol (mættet med hensyn til TNE), og nukleinsyrerne fældes med 2 rumfang ethanol ved -20°C i 10 timer. Bundfaldet isoleres ved centrifugering (HB-4-rotor, 20 min., 10.000 omdr./min., 0°C), hvorpå det genopløses i 20 µl farveblanding indeholdende 90% (rumfang/rumfang) formamid (Merck, pro analysis), 1 mM EDTA, 0,05% bromphenolblåt og 0,05% xylencyanolblåt. Prøven opvarmes til 90°C i 2 minutter og

sættes til en 5% polyacrylamidgel i Tris-borat-EDTA (jfr. Peacock et al. (39)). I autodiagrammet ses et enkelt bånd, som migrerer mellem 267 bp- og 435 bp-³²P-mærkede markør DNA-fragmenter dannet ved Hae III-nedbrydningen af plasmidet pBR 322. Det ³²P-mærkede cDNA-fragment ekstraheres fra gelen og renses som beskrevet af Mueller et al. (42). Der fås 20.000 Cerenkov cpm af den ³²P-mærkede humane IFN- α - og IFN- β -specifikke cDNA-sporingsdel.

c) Testning for kolonier indeholdende HuIFN cDNA (fig. 9)

1650 af de transformante kolonier fremstillet som beskrevet ovenfor (trin D) overføres til nitrocellulosefiltre BA 85 (Schleicher & Schuell, diameter 8 cm). Cellerne lyseres, og DNA'et denatureres og fikseres til filtrene in situ under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Grunstein og Hogness (20). Filtrene med kolonierne præhybridiseres i 4 x SET (en opløsning indeholdende 0,15 M NaCl, 30 mM Tris.HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA), 0,1% (vægt/rumfang) Ficoll 400 (Pharmacia), 0,1% (vægt/rumfang) polyvinylpyrrolidon (PVP-360, Sigma), 0,1% (rumfang/rumfang) BSA, 0,5% SDS, 50 μ g/ml denatureret kalvethymus DNA (fremstillet som følger: 5 mg kalve-thymus DNA (type I, Sigma) koges i 10 minutter i 0,5 M NaOH til forskydning af DNA'et, neutraliseres med 5 M eddikesyre og fældes med 2 rumfang ethanol ved -20°C. Bundfaldet isoleres ved centrifugering i en HB-4-rotor i 10 minutter ved 0°C og genopløses i 500 μ l 0,5 mM EDTA) ved 65°C i 4 timer under anvendelse af 20 ml blandinger pr. filter og hybridiseres med 10³ Cerenkov cpm af den ³²P-mærkede sporingsdel pr. nitrocellulosefilter i 5 x SET, 0,02% (vægt/rumfang) Ficoll, 0,01% polyvinylpyrrolidon, 0,02% (rumfang/rumfang) BSA, 0,2% SDS og 50 μ g/ml denatureret kalve-thymus DNA. Hybridiseringen gennemføres ved 65°C i 36 timer.

Filtrene skylles en gang i chloroform, to gange i SET, 0,5% SDS ved stuetemperatur og to gange i SET, 0,5% SDS i 1 time ved 60°C og en gang med 3 mM Trizma-base ved stuetemperatur i 1 time. Filtrene tørres ved aftrykning på 3 MM-papir (Whatman), og en røntgenfilm eksponeres med

filtrene under anvendelse af en skærm (Ilford intensifying screen) ved -80°C i 72 timer.

Ni positive kolonier identificeres på autoradiogrammet, og de anvendes til fortsat undersøgelse.

- 5 Da de primære kloner af transformerede celler lejlighedsvis indeholder mere end én art rekombinant DNA-molekyler, isoleres hybridplasmid DNA'erne fra de ni positivt hybridiserede kloner og anvendes til retransformering af *Escherichia coli* HB-101 som beskrevet ovenfor.
- 10 Hybridplasmid DNA'et isoleres på følgende måde: 1 koloni anvendes til inokulering af 10 ml tryptonmedium tilsat 10 $\mu\text{g/ml}$ tetracyclin som ovenfor i en 25 ml Erlenmeyer-kolbe. Kulturen rystes i 15-18 timer ved 37°C med 300 omdr./min. Cellerne isoleres ved centrifugering (Sorvall, 15 HS-4-rotor, 10 min. med 4000 omdr./min., 4°C). Der fås ca. 0,1 g celler, som resuspenderes i 1 ml 50 mM Tris.HCl (pH 8,0). 0,25 ml lysozymopløsning (10 mg/ml i 50 mM Tris.HCl (pH 8,0), lysozym fås fra Sigma) tilsættes, og efter inkubering ved 0°C i 10 min. tilsættes 0,15 ml 0,5 M 20 EDTA (pH 7,5). Efter yderligere 10 minutter ved 0°C tilsættes 60 μl 2% Triton X-100 (Merck). Efter 30 minutters forløb ved 0°C centrifugeres prøven i 30 minutter ved 15.000 omdr./min. og 4°C i en Sorvall SA-600-rotor. Den ovenstående væske deproteiniseres med 1 rumfangsdel 25 phenol (mættet med TNE). Faserne adskilles ved centrifugering (Sorvall HB-4-rotor) i 10 minutter ved 5.000 omdr./min. ved 4°C . Den øvre fase ekstraheres to gange med 1 rumfangsdel chloroform. RNase A fra pancreas (Sigma, 10 mg/ml i TNE, forvarmet i 10 minutter ved 85°C) tilsættes 30 til en slutkoncentration på 25 $\mu\text{g/ml}$, og blandingen inkuberes i 40 minutter ved 37°C . Opløsningen indstilles derefter på 1 M NaCl og 10% polyethylenglycol 6000 (Fluka, autoklaveret i 20 minutter ved 120°C) og inkuberes ved -10°C i 2 timer. Bundfaldet isoleres i en Sorvall 35 HB-4-rotor (20 minutter ved 10.000 omdr./min., 0°C) og genopløses i 100 μl TNE. DNA-opløsningen ekstraheres med

1 rumfang phenol, og DNA'et fældes med 2 rumfang ethanol ved -80°C i 10 minutter.

Bundfaldet fracentrifugeres i en Eppendorf centrifuge, og DNA'et genopløses i 20 μl 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) og 0,5 mM EDTA. Fra 10 ml kultur fås 8-10 μg hybrid-plasmid DNA.

Escherichia coli HB-101 transformeres med hvert enkelt af de ni isolerede hybrid DNA'er, og de transformerede celler overføres til agarplader indeholdende tetracyclin, som
10 beskrevet ovenfor (trin 4). Fra hver transformering udta-
ges tre tetracyclinresistente kloner, 10 ml kulturer frem-
stilles, og hybrid DNA'erne isoleres fra kulturerne som
beskrevet ovenfor.

Alle DNA-prøverne analyseres før og efter retransformeringen
15 ved spaltning med Pst I endonuklease og elektroforese gennem
en 1% agarosegel i 50 mM Tris-acetat (pH 7,8) og 1 mM EDTA.
Alle prøverne udviser identiske spaltningsmønstre før og ef-
ter retransformationen.

Et af de reklonede rekombinant DNA-molekyler giver 2 bånd,
20 et med mobiliteten af Pst I-spaltet pBR 322, det andet
med en mobilitet svarende til ca. 1000 bp. Det betegnes
CG-pBR 322/HLycIFN-1'b.

Et andet rekombinant DNA giver 3 bånd, et med mobiliteten for
Pst I-spaltet pBR 322, et med en mobilitet på ca. 600 bp
25 og et med en mobilitet på ca. 150 bp. Rekombinant DNA-mo-
lekylet i denne klon betegnes CG-pBR 322/HLycIFN- β_1 .

d. Karakterisering af klonerne CG-pBR 322/HLycIFN-1'b og
CG-pBR 322/HLycIFN- β_1

Rekombinantplasmid DNA'erne fra klonerne CG-pBR 322/HLyc-
30 IFN-1'b og CG-pBR 322/HLycIFN- β_1 isoleres fra kulturerne
som beskrevet ovenfor (trin Ec) og karakteriseres ved
bestemmelse af nukleotidsekvensen af den indsatte cDNA-
del under anvendelse af fremgangsmåden som beskrevet af
Maxam og Gilbert (15). I princippet anvendes følgende

metode:

Det isolerede rekombinantplasmid DNA nedbrydes med forskellige restriktionsendonukleaser. Enzymerne anvendes i alt væsentligt som beskrevet af leverandøren (New England Biolabs), idet dog BSA erstattes med gelatine i enzym-pufferne. Opløsningen indeholdende det spaltede DNA de-proteiniseres med phenol (mættet med TNE). DNA'et fældes med ethanol, genopløses i 50 mM Tris.HCl (pH 8,0) ved en DNA-koncentration på 50 µg/ml og inkuberes med 0,1 enheder alkalisk kalvetarmphosphatase (calf intestinal alkaline phosphatase) (Boehringer) pr. pmol DNA 5'-ender i 30 minutter ved 37°C. Enzymet inaktiveres ved opvarmning af opløsningen i 60 minutter til 65°C. DNA'et renses ved DEAE-cellulosekromatografi som beskrevet af Mueller et al. (42) og fældes med ethanol. DNA'et mærkes derpå 5'-terminalt med [γ -³²P]-ATP (>5000 Ci/mmol, Amersham) og T4-polynukleotidkinase (P-L Biochemicals) i alt væsentligt som beskrevet af Maxam og Gilbert (15), idet dog DNA'et ikke denatureres inden kinasereaktionen. Sædvanligvis er de specifikke aktiviteter 1-3.10⁶ cpm/pmol 5'-ender.

De mærkede DNA-fragmenter spaltes med en anden restriktionsendonuklease, og produkterne adskilles ved elektroforese gennem en 6%, 8% eller 10% polyacrylamidgel i Tris-borat-EDTA-puffer. DNA-fragmenterne ekstraheres fra gelen og renses som beskrevet af Mueller et al. (42). Til bestemmelsen af nukleotidsekvenserne nedbrydes DNA-fragmenterne kemisk, og produkterne adskilles ved polyacrylamidgelelektroforese som beskrevet af Maxam og Gilbert (15).

Specielt behandles de isolerede plasmid DNA'er fra klonen CG-pBR 322/HLycIFN-1'b på følgende måde. 5 µg af plasmidet DNA nedbrydes med Bgl II, mærkes 5'-terminalt og spaltes med Pvu II. Pvu II-Bgl II*- og Bgl II-Pvu II*-DNA-fragmenterne isoleres på en 6% polyacrylamidgel. (* angiver mærkningsstedet). Separat nedbrydes 5 µg af plasmidet med Alu I, markeres 5'-terminalt og spaltes med Pst I. Pst I-Alu I*-DNA-fragmentet isoleres på en 8% polyacrylamidgel.

De enkelte fragmenter nedbrydes og sekvenseres derpå i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge Maxam og Gilbert. Den fremkomne nukleotidsekvens er angivet i fig.10. Et stræk på ca. 25-35 deoxyguanosinrester er i 5'-enden
 5 foran den indsatte cDNA-del. Den viste nukleotidsekvens ligner en del sekvensen af IFN- α (type F) cDNA beskrevet af Goeddel et al. [(43), jfr. også Weissmann (44)], men den udviser ikke desto mindre en hel del tydelige afvigelser (punktmutationer), hvoraf nogle påvirker de resulterende aminosyrer (jfr. fig.10).

Det isolerede plasmid DNA fra klonen CG-pBR 322/HLycIFN- β_1 behandles på tilsvarende måde. 5 μ g af plasmidet nedbrydes med Pvu II og mærkes 5'-terminalt. Halvdelen af blandingen spaltes med Pst I, og resten spaltes med Bgl II. Pst I-
 15 Pvu II*- og Bgl II-Pvu II*-fragmenterne isoleres ved elektroforese på en 6% polyacrylamidgel og nedbrydes som beskrevet ovenfor. Nukleotidsekvensen (N-terminalsekvens) er anført i fig. 5 og viser, at den indsatte cDNA-del begynder ved nukleotid nr. 102 i IFN- β_1 cDNA'et som beskrevet af Taniguchi et al. (45). Den indsatte cDNA-del er
 20 derfor i stand til at kode for human IFN- β_1 , som mangler 11 aminosyrer ved N-afslutningen. Den indsatte cDNA-del er flankeret ved 5'-enden af et stræk på ca. 20-25 deoxyguanosinrester og udviser en punktmutation ved stilling
 25 153, hvori en C-rest omdannes til en T-rest uden påvirkning af den resulterende aminosyre.

e. Identificering af kloner indeholdende rekombinant DNA-molekyler, som kryds-hybridiserer til indsatte dele af CG-pBR 322/HLycIFN-1'b og CG-pBR 322/HLycIFN- β_1

30 Rekombinantplasmid DNA'erne fra klonerne CG-pBR 322/HLycIFN-1'b og CG-pBR 322/HLycIFN- β_1 isoleres fra kulturerne som beskrevet ovenfor (trin Ec). CG-pBR 322/HLycIFN-1'b plasmid-DNA'et (5 μ g) nedbrydes med Bgl II, mærkes 5'-terminalt og spaltes med Pvu II. Separat nedbrydes det isolerede CG-pBR 322/HLycIFN- β_1 plasmid-DNA (5 μ g) med Pvu
 35 II, mærkes 5'-terminalt og spaltes med Bgl II. Pvu II-

Bgl II* (351 bp) DNA-fragmentet (prøve A) og Pvu II*-Bgl II (368 bp) DNA-fragmentet (prøve B) isoleres fra en 8% polyacrylamidgel som beskrevet ovenfor (trin Ed) og anvendes til in situ kolonihybridisering (se nedenfor).

- 5 Spaltningen af plasmid DNA'erne, mærkningen og rensningen af DNA-fragmenterne gennemføres på samme måde som beskrevet ovenfor (trin Ed).

- 4000 af de transformante kolonier fremstillet som beskrevet ovenfor (trin D) overføres til nitrocellulosefiltre
- 10 BA 85 (Schleicher & Schuell, diameter 8 cm). Cellerne lyseres, og deres DNA denatureres og fikseres til filtrene in situ ved fremgangsmåden ifølge Grunstein og Hogness (20). Hybridiseringer til prøverne A og B (begge prøver er blandede) foretages som beskrevet ovenfor (trin
- 15 Ec). Ved autoradiografi identificeres 6 positive kolonier, hvoraf 3 betegnes

E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-4₁
 E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-5₁. og
 E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-8₁

- 20 og anvendes til yderligere undersøgelser. Plasmid DNA'erne fra disse kloner isoleres, retransformeres og reisoleres som beskrevet ovenfor (trin Ec, Ed).

- For at bestemme naturen af de indsatte dele i rekombinant-DNA'erne foretages bestemmelse af nukleotidsekvenserne i
- 25 de indsatte cDNA-dele (delvis eller fuldstændigt) ved anvendelse af den ovenfor beskrevne almindelige fremgangsmåde (trin Ed).

- Nærmere betegnet nedbrydes 5 µg af hver af de isolerede plasmid-DNA'er CG-pBR 322/HLycIFN-4₁ og CG-pBR 322/HLycIFN-
- 30 8₁ med Pvu II, mærkes 5'-terminalt og spaltes med Pst I. DNA-fragmenterne fraktioneres på en 8% polyacrylamidgel, og Pst I-Pvu II* (~120 bp) fra 8₁-DNA og Pst I-Pvu II* (82 bp) fra 4₁-DNA isoleres som sædvanligt.

Det isolerede plasmid-DNA CG-pBR 322/HLycIFN-5₁ behandles på følgende måde. 5 µg af plasmid-DNA'et nedbrydes med Hae III, mærkes 5'-terminalt og spaltes med Pst I. Pst I-Hae III* (57 bp) DNA-fragmentet isoleres på en 10%'s polyacrylamidgel. Separat nedbrydes 5 µg af plasmidet med EcoR I, mærkes 5'-terminalt og spaltes med Pst I. Pst I-EcoR I* (235 bp) og EcoR I*-Pst I (~700 bp) DNA-fragmenterne isoleres på en 8%'s polyacrylamidgel. De forskellige DNA-fragmenter underkastes sekvensanalyse under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Maxam og Gilbert (15).

Nukleotidsekvenserne i de indsatte cDNA-dele er vist i fig.12-14. I fig.12 er nukleotidsekvensen i den indsatte cDNA-del af CG-pBR 322/HLycIFN-4₁ vist. Den indsatte del støder ved 5'-enden op til et stræk på 23 deoxyguanosinrester og omfatter en del af IFN-α₂ (Le) cDNA'et beskrevet af Streuli et al. (46). I det 3'-extracistroniske område er der nogle mindre afvigelser (punktmutationer) og et stræk på yderligere 318 nukleotider. Nukleotidsekvensen for den indsatte cDNA-del af CG-pBR 322/HLycIFN-8₁ er vist i fig.13. Den indsatte del støder ved 5'-enden op til et stræk på 20-23 deoxyguanosinrester og ligner, men er ikke identisk med det IFN-α (type D) cDNA, som er beskrevet af Goeddel et al. [(43), jfr. også Mantei et al. (27)]. Bortset fra forskelle i cDNA-områderne før og efter IFN-kodningssekvensen indeholder IFN-genet i stillingerne 28-30 en GCC-triplet og i stillingerne 409-411 en GCG-triplet, som koder for alanin i stedet for henholdsvis GTC og GTG, der koder for valin. Nukleotidsekvensen for den indsatte cDNA-del af CG-pBR 322/HLycIFN-5₁ (se fig.14) viser et stræk på 17 deoxyguanosinrester ved 5'-enden. Nukleotidsekvensen er beslægtet med nukleotidsekvensen i IFN-α (type B) cDNA beskrevet af Goeddel et al. (43). Der er imidlertid yderligere nukleotider ved 5'-enden i den indsatte cDNA-del i HLycIFN-5₁, og der findes ligeledes punktmutationer, udskæringer og indsætninger i det extracistroniske område og i IFN-kodningssekvensen, især i stillingerne 22 og 361-372.

F. Syntese af humane interferoner ved hjælp af *Escherichia coli* indeholdende humane IFN-specifikke rekombinant-DNA-molekyler

De 5 kloner, som indeholder humane IFN-specifikke rekombinant DNA-molekyler, nemlig

- 10 E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-1'b
 E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-4₁
 E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-5₁
 E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-8₁ og
 E. coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-β₁

afprøves for IFN-aktivitet, hvilket i hvert enkelt tilfælde gennemføres på følgende måde:

15 Kulturer af den tilsvarende *Escherichia coli*-klon (30 ml suspensioner) dyrkes i tryptonmedium til en optisk tæthed (OD₆₅₀) på ca. 1. Cellerne isoleres og resuspenderes i 0,5 ml af en vandig opløsning indeholdende 30 mM NaCl og 50 mM Tris.HCl (pH 8,0). Lysozym (Sigma) tilsættes til 1 mg/ml. Efter 30 minutter ved 0°C fryses suspensionerne (flydende nitrogen) og optøes (ved 37°C) 5 gange og cen-
 20 trifugeres i 20 minutter ved 20.000 omdr./min. i en SS Sorvall-rotor ved 4°C. De ovenstående væsker afprøves for IFN-aktivitet under anvendelse af den cytopatiske bioanalyse ifølge Armstrong (29) som beskrevet i trin lc. Der findes følgende aktiviteter:

25	Ekstraktkilde	IFN-aktivitet
	E. coli HB 101 indeholdende rekombinant-DNA	(IE ml)
	CG-pBR 322/HLycIFN-1'b	0;0
	CG-pBR 322/HLycIFN-4 ₁	0;0
30	CG-pBR 322/HLycIFN-5 ₁	10.000;10.000
	CG-pBR 322/HLycIFN-8 ₁	100;100
	CG-pBR 322/HLycIFN-β ₁	0;0

Muligvis indeholder kloner, som ikke udviser målelige IFN-aktiviteter, rekombinant-DNA'er, hvori den indsatte

HuLyIFN-cDNA-del har en forkert orientering med hensyn til transskriptionsretningen. Rekombinant-DNA'et fra en sådan klon (CG-pBR 322/HLycIFN-1'b) indeholdende en indsat cDNA-del i fuld længde reorienteres derfor på følgende måde:

Plasmid-DNA'et fra klonen *Escherichia coli* (HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-1'b) isoleres som beskrevet ovenfor (trin Ec) og spaltes med Pst I. 0,5 µg af det spaltede DNA i 20 µl af en pufferblanding indeholdende 20 mM Tris.HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 25 mM NaCl og 50 µg/ml gelatine behandles med 0,2 enheder T4 DNA ligase (Biolabs) og 0,5 mM ATP i 2 timer ved 15°C. *Escherichia coli* HB 101 transformeres med cDNA-blandingen som beskrevet ovenfor (trin D). Transformerede kolonier udvælges på McConkey-agarplader tilsat tetracyclin, hvorefter de genanbringes på nitrocellulosefiltre. 4 bakteriekolonier, som hybridiserer til det ³²P-mærkede Pvu II-Bgl II*-fragment (351 bp) fra rekombinant-DNA'et CG-pBR 322/HLycIFN-1'b (jfr. trin Ee) betegnes *Escherichia coli* HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-1'b₁ til 1'b₄. Ekstrakter af de fire kloner fremstilles og afprøves for IFN-aktivitet som beskrevet ovenfor. Der opnås følgende aktiviteter:

Ekstraktkilde	IFN-aktivitet
<i>E. coli</i> HB 101 indeholdende	
rekombinant-DNA	(IE ml)
CG-pBR 322/HLycIFN-1'b ₁	0;0
CG-pBR 322/HLycIFN-1'b ₂	0;0
CG-pBR 322/HLycIFN-1'b ₃	0;0
CG-pBR 322/HLycIFN-1'b ₄	30;30

Plasmidet CG-pBR 322/HLycIFN-1'b₄ indeholder derfor en indsat cDNA-del, som er i stand til at styre syntesen af et polypeptid med IFN-aktivitet.

G. Dannelse af rekombinantplasmider, som kan producere polypeptider med IFN-aktivitet i høj koncentration, og transformering af *Escherichia coli* HB 101 med disse plasmider

5 I. Dannelse af CG-pBR (AP)/LyIFN- α -1 rekombinantplasmid

For at forøge udbyttet af det IFN-specifikke protein fra klonen *Escherichia coli* HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-1'b gennemføres nedenstående synteserække som vist skematisk i fig.15.

10 a. Fremstilling af cDNA-indsætningsdelen

Rekombinantplasmid-DNA'et (150 μ g) fra klonen *Escherichia coli* HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-1'b spaltes med Pst I (Biolabs) under anvendelse af standardfremgangsmåder (jfr. trin Ed). Efter ekstraktion med phenol og fæld-

- 15 ning med ethanol isoleres den afskårne indsætningsdel ved hjælp af saccharosegradientcentrifugering (5-23%) i 50 mM Tris.HCl (pH 8,0) og 1 mM EDTA. Centrifugeringen gennemføres ved 35.000 omdr./min. i en TST-41-rotor (Konttron AG) ved 15°C i 16 timer. Der opsamles fraktioner
- 20 på 0,3 ml med en ISCO-gradientkollektor med 1 ml/min. Fraktionerne indeholdende det lille fragment (dvs. indsætningsdelen) hældes sammen. DNA'et fældes med ethanol som sædvanlig, og bundfaldet isoleres ved centrifugering i en HB-4-rotor (Sorvall) ved 10.000 omdr./min. ved 0°C
- 25 i 10 minutter. Bundfaldet genopløses i 60 μ l 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) og 0,05 mM EDTA. Der udvindes 30 μ g DNA bestemt ved måling af den optiske tæthed.

- DNA-indsætningsdelen (10 μ g) nedbrydes med Hae III (Biolabs), og fragmenterne fraktioneres på en 2% agarose-
- 30 gel i en opløsning indeholdende 50 mM Tris, 50 mM borsyre, 1 mM EDTA og 0,5 μ g/ml ethidiumbromid. De største DNA-fragmenter, Hae III-Pst I (869 bp) og Hae III-Hae III (82 bp, jfr. fig. 15, henholdsvis fragmenterne 3 og 4), udskæres hver for sig fra gelen, overføres ved hjælp af en injek-
- 35 tionssprøjte til 5 ml 0,15 M NaCl, 50 mM Tris.HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA og elueres natten over ved rystning. Eluatet

ledes gennem en 100 μ l DE-52 (Whatman) pasteur-pipette-søjle til absorption af DNA'et. Søjlen vaskes med 2 ml af den samme puffer, og DNA'et elueres med 400 μ l af en opløsning indeholdende 1,5 M NaCl, 50 mM Tris (pH 8,0) og 1 mM EDTA. DNA'et fældes med 2 rumfang ethanol ved -20°C natten over. Bundfaldet fracentrifugeres i en Eppendorf-centrifuge.

Hae III-Hae III-DNA-fragmentet (82 bp) genopløses og nedbrydes med Sau 3A (Biolabs). Enzymet inaktiveres ved opvarmning til 65°C i 30 minutter. Der tilsættes 1 μ g af Hae III-Pst I DNA-fragmentet (869 bp), opløsningen indstilles til 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT og 0,5 mM ATP, og der tilsættes T4 DNA-ligase (Biolabs) til 30 enheder/ μ l reaktionsrumfang. Opløsningen inkuberes i 10 timer ved 15°C. Efter ekstraktion med phenol og chloroform fraktioneres blandingen på en 2% agarosegel i Tris-borat-EDTA i nærværelse af ethidiumbromid. Sau 3A-Pst I DNA-fragmentet (jfr. fig. 15, fragment 5) ekstraheres som beskrevet ovenfor, fældes med ethanol og genopløses i 10 μ l af en opløsning indeholdende 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) og 0,05 mM EDTA.

b. Fremstilling af DNA-fragmentet indeholdende det β -lactamaseregulerende område (ApPr) af pBR 322
Plasmidet pBR 322 spaltes med Pst I (jfr. trin Cb) og behandles med 4 enheder/ml af exonukleasen Bal 31 (Bethesda Research Lab.) ved 30°C i 4-10 minutter til fjernelse af segmentet, som koder for β -lactamasen.

En kemisk DNA-binder med formlen



syntetiseres under anvendelse af den ovenfor beskrevne fremgangsmåde (trin Ea). Binderen adderes til det Bal 31-behandlede pBR 322 DNA på konventionel måde. Det dannede hybridmolekyle spaltes med restriktionsendonukleaser Bcl I (Biolabs) og EcoR I. Nedbrydningsprodukterne fraktioneres på en 8%

polyacrylamidgel i Tris-borat-EDTA som beskrevet ovenfor (trin Ba). DNA-fragmenter (ApPr DNA-fragmenter), som migrerer mellem 184 bp- og 234 bp-markerings DNA'er isoleres som beskrevet ovenfor (trin Ia) og fældes med ethanol på sædvanlig måde. Bundfaldet genopløses i en opløsning indeholdende 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) og 0,05 mM EDTA.

c. Ligering af ApPr DNA-fragmentet til cDNA-indsætningsdelen

Opløsningerne indeholdende ApPr DNA-fragmenterne og cDNA-indsætningsdelen hældes sammen. Blandingen indstilles til 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT og 0,5 mM ATP og inkuberes med 30 enheder/ μ l T4 DNA-ligase (Biolabs) ved 15°C i 12 timer. Efter ekstraktion med phenol og chloroform fraktioneres blandingen på en 1% lavtsmeltende saccharosegel (Biorad). Det dannede ApPr-cDNA-fragment bindes til det store fragment fra pBR 322 spaltet med både Pst I (Biolabs) og EcoR I (Biolabs) på følgende måde. Gelstykket indeholdende ApPr cDNA-fragmentet (ca. 20 μ l) blandes med Pst I-EcoR I-fragmentet fra pBR 322, smeltes ved 65°C i 2 minutter, afkøles til 37°C, indstilles til 0,5 mM ATP, 10 mM DTT og 10 mM $MgCl_2$ og inkuberes med 30 enheder/ μ l T4 DNA-ligase (Biolabs) i 12 timer ved 15°C.

En tiendedel af rumfanget af en opløsning indeholdende 100 mM Tris.HCl (pH 7,5), 100 mM $CaCl_2$ og 100 mM $MgCl_2$ sættes til opløsningen indeholdende plasmidet CG-pBR(AP)/LyIFN- α -1. De kombinerede opløsninger opvarmes i 10 minutter til 65°C til inaktivering af ligasen, hvorefter de afkøles til 37°C. Opløsningen anvendes derpå til transformeringen af Ca^{2+} -behandlet Escherichia coli HB 101 som beskrevet ovenfor (trin D), og der fremstilles plader på McConkey-agar tilsat 10 μ g/ml tetracyclin. De transformerede kolonier testes for IFN-aktivitet (jfr. trin F).

Klonen, som danner den største IFN-aktivitet, udvælges og betegnes *Escherichia coli* HB 101 CG-pBR(AP)/LyIFN- α -1. Der findes en aktivitet på 40.000 (IE/ml), som repræsenterer en 1300 gange stimulering sammenlignet med den oprindelige klon *Escherichia coli* HB 101 CG-pBR 322/HLyc-IFN-1'b.

Rekombinantplasmid DNA'et fra klonen CG-pBR(AP)/LyIFN- α -1 isoleres fra kulturen som beskrevet ovenfor (trin Cc) og karakteriseres ved bestemmelse af nukleotidsekvensen af cDNA-indsætningsdelen (IFN-gen) og det β -lactamaseregulerende område. Resultaterne fremgår af fig. 16.

II. Fremstilling af rekombinantplasmidet CG-pBR(AP)/LyIFN- α -3

Udbytterne af det IFN-specifikke protein fra klonen Escherichia coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-8₁ forbedres på
5 følgende måde (jf. fig. 17).

a. Fremstilling af DNA-fragmentet indeholdende det β -lactamaseregulerende område fra CG-pBR(AP)/LyIFN- α -1

CG-pBR(AP)/LyIFN- α -1 DNA (100 μ g) spaltes med Hind III (Bio-
labs) og Bgl II (Biolabs). Efter ekstrahering med phenol
10 og fældning med ethanol isoleres det fraspaltede DNA-frag-
ment ved anvendelse af saccharosedensitetsgradientcentri-
fugering (5-23%) i 50 mM Tris-HCl (pH-værdi 8,0) og 1 mM
EDTA. Centrifugeringen gennemføres ved 58000 rpm i en
TST 60 rotor (Kontron AG) ved 15°C i 4 timer. Der opsam-
15 les fraktioner på 0,2 ml som beskrevet ovenfor. Fraktio-
nerne indeholdende det lille fragment (Hind III-Bgl II)
hældes sammen, og DNA'et udfældes med ethanol som sædvan-
ligt. Bundfaldet genopløses i 80 μ l 10 mM Tris-HCl (pH-
værdi 7,5) og 0,05 mM EDTA. Der udvindes 16 μ g DNA be-
20 stemt ved måling af den optiske tæthed.

DNA-fragmentet (Hind III-Bgl II) (4 μ g) spaltes med Sau
3A (Biolabs), og nedbrydningsprodukterne fraktioneres på
en 6% polyacrylamidgel i tris-borat-EDTA som beskrevet
ovenfor. DNA-fragmenterne farves i EtBr (0,5 μ g/ml),
25 Hind III-Sau 3A DNA-fragmentet (239 bp) ekstraheres og
isoleres på den ovenfor beskrevne måde. DNA'et udfældes
med ethanol på sædvanlig måde. Bundfaldet genopløses i
20 μ l 10 mM Tris-HCl (pH-værdi 7,5) og 0,05 mM EDTA.

b. Fældning af den indsatte cDNA-del

30 Den indsatte cDNA-del spaltes fra rekombinantplasmidet
CG-pBR 322/HLycIFN-8₁ med Pst I på samme måde som beskre-
vet ovenfor (afsnit Ia).

cDNA-indsætningsdelen (2 µg) spaltes med 2,5 enheder Sau 3A (Biolabs) i 10 µg/ml EtBr og inkuberes ved 37°C i 60 minutter. Spaltningsprodukterne ekstraheres med phenol, og DNA'et fældes i ethanol på den ovenfor beskrevne måde. DNA-fragmenterne fraktioneres på en 1,2% agarosegel i en opløsning indeholdende 50 mM Tris, 50 mM borsyre, 1 mM EDTA og 0,5 µg/ml ethidiumbromid.

Det næststørste DNA (Sau 3A-Pst I: 693 bp) ekstraheres fra gelen og renses under anvendelse af den i afsnit Ia) beskrevne fremgangsmåde. DNA'et genopløses i 20 µl 10 mM Tris·HCl (pH-værdi 7,5) og 0,05 mM EDTA.

c. Ligering af Hind III-Sau 3A DNA-fragmentet til cDNA-indsætningsdelen (Sau 3A-Pst I)

Lige store mængder af de to DNA-fragmenter (~ 50 ng) inkuberes i en opløsning indeholdende 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP og 30 enheder/µl T4 DNA-ligase (Biolabs) ved 15°C i 3 timer. Blandingen inkuberes i 15 minutter ved 80°C og indstilles på 50 mM NaCl. DNA-blandingen spaltes med 0,5 enheder Pst I (Biolabs) og en enhed Hind III (Biolabs) i 20 minutter ved 37°C. DNA'et ekstraheres med phenol, der fældes med ethanol, og produktet genopløses i 20 µl 10 mM Tris·HCl (pH-værdi 7,5) og 0,05 mM EDTA.

Halvdelen af den fremkomne blanding ligeres til det store Hind III-Pst I DNA-fragment fra plasmidet pBR 322 (~ 100 ng) i 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT og 0,5 mM ATP indeholdende 30 enheder/µl T4 DNA-ligase (Biolabs) i 2 timer ved 15°C.

En tiendedel af rumfanget af den ovenfor fremstillede op-

løsning anvendes til transformering af *Escherichia coli* HB 101 som beskrevet ovenfor under trin D. De transformerede kolonier anvendes til afprøvning for IFN-aktivitet som beskrevet ovenfor (jf. trin F).

- 5 Klonen, som syntetiserer IFN-aktivitet i højeste koncentration, udvælges og betegnes *Escherichia coli* HB 101 CG-pBR(AP)/LyIFN- α -3.

IFN-aktiviteten bestemmes som beskrevet ovenfor (trin F). Der konstateres en aktivitet på 70.000 (IE/ml), hvilket
10 repræsenterer en 700 gange stimulering sammenlignet med den oprindelige klon *Escherichia coli* HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-8₁.

Rekombinantplasmidet DNA'et fra klonen CG-pBR(AP)/LyIFN- α -3 isoleres fra kulturen som beskrevet ovenfor (trin Cc)
15 og karakteriseres ved bestemmelse af nukleotidsekvensen i cDNA-indsætningsdelen (IFN-gen) og i det β -lactamase-regulerende område. Resultaterne er vist i fig. 18.

Fremstillingsfremgangsmåden for plasmidet CG-pBR(AP)/LyIFN- α -3 kan generelt anvendes til alle α -IFN cDNA-gener eller
20 hensigtsmæssigt spaltede kromosomale α -IFN-gener..

Eksempelvis fremstilles plasmidet CG-pBR(AP)/LyIFN- α -2 ud fra plasmidet CG-pBR 322/HLycIFN-5₁ på samme måde som beskrevet for plasmidet CG-pBR(AP)/LyIFN- α -3. Dette nye plasmid indeholder DNA-indsætningsdelen fra CG-pBR 322/
25 HLycIFN-5₁ og det β -lactamaseregulerende område fra CG-pBR(AP)/LyIFN- α -1. En klon med betegnelsen *Escherichia coli* HB 101 CG-pBR(AP)/LyIFN- α -2 udvælges som beskrevet ovenfor. Der konstateres en IFN-aktivitet på 50.000 (IE/ml), hvilket repræsenterer en femdobbel stimulering sammenlignet med den oprindelige *Escherichia coli* HB 101 CG-pBR
30 322/HLycIFN-5₁. Nukleotidsekvensen i cDNA-indsætningsdelen og det β -lactamaseregulerende område i plasmidet CG-pBR(AP)/LyIFN- α -2 bestemmes som beskrevet ovenfor og er angivet i fig. 19.

III. Deponering af fremstillede mikroorganismer

Mikroorganismer og rekombinant DNA molekyler fremstillet som beskrevet i eksempel 10 er eksemplificeret ved kulturer deponeret i kultursamlingen i Agricultural Research Culture Collection (NRRL) den 14. september 1981 og er tildelt følgende deponeringsnumre:

- Escherichia coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN- β_1 : NRRL B-12528
- Escherichia coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-4 $_1$: NRRL B-12529
- Escherichia coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-1'b: NRRL B-12530
- Escherichia coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-5 $_1$: NRRL B-12531
- 10 Escherichia coli HB 101 CG-pBR 322/HLycIFN-8 $_1$: NRRL B-12532

Eksempel 11.

De lymfoblastoide IFN-1'b og IFN-5 $_1$ kodningssekvenser af Escherichia coli plasmiderne CG-pb322/HLycIFN-1'b og -5 $_1$ (jf. eksempel 10) kan underklones i plasmid p30 (jf. eksempel 4) på samme måde som beskrevet for IFN-8 $_1$ i eksempel 5 og 6. En partiel nedbrydning med restriktionsendonuklease HaeIII er nødvendig. Gærhybridplasmiderne fremstillet på denne måde er p30IFN2(1'b), p30IFN2'(1'b), p30IFN2(5 $_1$) og p30IFN2'(5 $_1$).

20 Disse fremstillede hybridplasmider kan anvendes til at transformere Saccharomyces cerevisiae RH971 som beskrevet i eksempel 7. Der kan udvælges følgende kolonier indeholdende et hybridplasmid med en indsat lymfoblastoid IFN cDNA-del:

- Saccharomyces cerevisiae RH971/p30IFN2(1'b)
- 25 Saccharomyces cerevisiae RH971/p30IFN2'(1'b)
- Saccharomyces cerevisiae RH971/p30IFN2(5 $_1$)
- Saccharomyces cerevisiae RH971/p30IFN2'(5 $_1$)

Eksempel 12.

Analogt med den i eksempel 9 beskrevne fremgangsmåde kan der

ud fra plasmiderne p30IFN2(1'b), -(5₁), -(8₁') og p30IFN2'(1'b), -(5₁) fremstilles nedenstående gærhybridplasmider:

pJDB207/IFN2(1'b), pJDB207/IFN2'(1'b), pJDB207/IFN2(5₁), pJDB207/IFN2'(5₁) og pJDB207/IFN2(8₁').

- 5 Disse hybridplasmider kan transformeres til *Saccharomyces cerevisiae* stamme RH971 under udvælgelse af leucin prototrofe kolonier. Der kan dannes følgende kolonier indeholdende et hybridplasmid med en indsat lyfoblastoid IFN cDNA-del:

- Saccharomyces cerevisiae RH971/pJDB207/IFN2(1'b)
 10 Saccharomyces cerevisiae RH971/pJDB207/IFN2'(1'b)
 Saccharomyces cerevisiae RH971/pJDB207/IFN2(5₁)
 Saccharomyces cerevisiae RH971/pJDB207/IFN2'(5₁)
 Saccharomyces cerevisiae RH971/pJDB207/IFN2(8₁')

Eksempel 13.

- Fremstilling af et kopieringsplasmid indeholdende PHO5 promoto-
 15 ren og PHO5 transskriptionstermineringssignaler (se fig. 20)

a) Eliminering af EcoRI restriktionsstedet i plasmid p30:

- Fremgangsmåden illustreret i fig. 20-22 kræver eliminering af det entydige EcoRI restriktionssted i plasmid p30. 5 µg p30 DNA (jf. eksempel 4) nedbrydes fuldstændigt med restriktionsendonuklease EcoRI (Boehringer). Til anbringelse på de
 20 dannede klæbrige ender inkuberes 1 µg EcoRI nedbrudt p30 i 50 µl 50 mM NaCl, 10 mM Tris.HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,25 mM dATP og 0,25 mM dTTP i 30 minutter ved 37°C med 1 en-
 25 udvindes ved ethanol-fældning, bindes på sædvanlig måde og anvendes til transformering af kompetente *Escherichia coli* HB101 celler som beskrevet i eksempel 4. Kloner som er resistente overfor EcoRI nedbrydning betegnes som p30/EcoRI^R.

b) Isolering af et 0,37 kb Sau3A-PstI PHO5 transskriptions-termineringsfragment

PHO5 transskriptet er blevet kortlagt ved hjælp af S1 nuklease kortlægning (mapping) (48). Signalerne for transskriptions-terminering er lokaliseret i et 0,37 kb Sau3A-PstI fragment af PHO5 genet. Nukleotidsekvensen af Sau3A-PstI fragmentet er anført i fig. 21.

5 µg pJDB207/PHO5, PHO3 DNA (jf. eksempel 2) nedbrydes fuldstændigt med restriktionsendonukleaser Sau3A og PstI. Restriktionsfragmenterne adskilles på en lodret 1,5% lavt smeltende agarosegel i TB puffer. 0,37 kb Sau3A-PstI fragmentet lokaliseres ved farvning med ethidiumbromid, og der udskæres en mindst mulig gelblok indeholdende dette DNA fragment.

c) Kloning af Sau3A-PstI PHO5 fragmentet i M13mp9

M13mp9 fag DNA er en nyttig kloningsvektor med en gruppe entydige restriktionssteder (49). 5 µg M13mp9 DNA nedbrydes fuldstændigt med restriktionsendonukleaserne BamHI og PstI. Det større 7,2 kb DNA-fragment adskilles fra et meget lille fragment (8 bp) på en 0.8% lavt smeltende agarosegel. Gelblokken indeholdende det store DNA-fragment skæres ud af gelen. Gelblokke med 0,37 kb Sau3A-PstI fragmentet af pJDB207/PHO5, PHO3 (jf. eksempel 13b)) og 7,2 kb BamHI-PstI fragmentet af M13mp9 smeltes ved 65°C, blandes i omtrent ækvimolære mængder og fortyndes med vand til en agarosekoncentration på 0,3%. Der gennemføres binding i en 200 µl opløsning indeholdende 60 mM Tris.HCl pH 7,5, 19 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP og 600 enheder T4 DNA ligase (Biolabs). Der foretages transduktion af kompetente celler af stammen Escherichia coli JM101 (Ca++) i overensstemmelse med håndbogen "M13 cloning and DNA sequencing system" udgivet af New England Biolabs. Fager fra et antal hvide plaques dyrkes og analyses med hensyn til størrelsen af de indsatte DNA-dele ved spaltning med restriktionsendonukleaser EcoRI og PstI.

En M13mp9 afledt klon indeholdende Sau3A-PstI PHO5 transskriptionstermineringsfragmentet isoleres og betegnes M13mp9/PHO5 (Sau3A-PstI).

5 d) Kloning af PHO5 transskriptionstermineringsfragmentet i p30/EcoRI^R

Det oprindelige PHO5 transskriptionstermineringsfragment klonet i fag M13mp9 (M13mp/PHO5(Sau3A-PstI)) genklones som et HaeIII-HindIII fragment i plasmid p30/EcoRI^R spaltes med BalI og HindIII: M13mp/PHO5(Sau3A-PstI) DNA spaltes fuldstændigt med restriktionsendonukleaserne HaeIII og HindIII. De dannede to DNA-fragmenter adskilles på en 1,5% lodret lavtsmeltende agarosegel i TBE puffer. 0,39 kb fragmentet isoleres i en gelblok udskåret af gelen. p30/EcoRI^R DNA nedbrydes med BalI og HindIII. Det store 3,98 kb fragment adskilles på en 0,8% lavtsmeltende agarosegel i TBE puffer og isoleres ved udskæring af en gelblok indeholdende DNA-fragmentet.

Gelblokke indeholdende 0,39 kb HaeIII-HindIII PHO5 transskriptionstermineringsfragmentet og 3,98 kb BalI-HindIII fragmentet af p30/EcoRI^R smeltes ved 65°C og blandes i omtrentlig ækvimolare mængder. Ligering og transformation af kompetente Escherichia coli HB101 celler gennemføres som beskrevet i eksempel 4. DNA fra transformerede celler analyseres ved spaltning med balI og HaeIII. En klon indeholdende PHO5 transskriptionstermineringsfragmentet analyseres yderligere og betegnes som p31 (se fig. 20).

Kopieringsplasmid p31 indeholder PHO5 promotorområdet med en del af signalsekvensen af PHO5 og i nabostilling dertil et DNA-fragment med PHO5 transskriptionsterminerings signaler. Fremmede kodningssekvenser, som skal kopieres eller udtrykkes i denne vektor, kan hensigtsmæssigt indsættes mellem promotor- og transskriptionstermineringssekvenser.

Eksempel 14.

Insætning af lymfoblastoid interferon-5₁ DNA i plasmid p31
(se fig. 22)

5 a) Isolering af HaeIII-HpaI fragmenter af plasmid CG-
pBR322/HLycIFN-5₁

Escherichia coli stamme HB101 CG-pBR322/HLycIFN-5₁ (se eksempel 10E) dyrkes i 100 ml LB medium tilsat 10 µg/ml tetracyclin, og plasmid DNA'et isoleres under anvendelse af den i eksempel 2 beskrevne fremgangsmåde. 10 µg CG-pBR322/HLycIFN-5₁ DNA nedbrydes fuldstændigt med restriktionsendonukleaser PstI og HpaI. Restriktionsfragmenterne adskilles på en præparativ 0,8% lavt smeltende agarosegel. PstI-HpaI fragmentet på ca. 860 bp indeholdende IFN-5₁ kodningssekvensen udskæres fra gelen og elueres fra agarosegelen under anvendelse af den i eksempel 4a) beskrevne fremgangsmåde, hvorefter der foretages rensning ved hjælp af DE52 ionbytningskromatografi under anvendelse af den i eksempel 5a beskrevne fremgangsmåde.

PstI-HpaI fragmentet indeholder 3 HaeIII steder: i stilling 41, 65 og 146 (fra ATG'et) i IFN-5₁ kodningssekvensen. Partielt HaeIII nedbrydning fører til 3 HaeIII-HpaI fragmenter på henholdsvis 699 bp, 789 bp og 804 bp. HaeIII nedbrydning reguleres omhyggeligt til opnåelse af omtrentlig lige store mængder af alle tre fragmenter. Blandingen af fragmenterne ekstraheres med phenol, fældes med ethanol og resuspenderes i 10 mM Tris pH8 ved en koncentration på 0,1 mg/ml.

b) Fremstilling af BalI spaltet, dephosphoryleret plasmid p31

6 µg p31 DNA (se eksempel 13d)) nedbrydes fuldstændigt med restriktionsendonuklease BalI (BRL). Efter phenolekstraktion og fældning med ethanol genopløses DNA'et i 100 µl 50 mM Tris pH 8,0, og opløsningen ledes gennem et 50 µl lag af ækvilibreret Chelex 100 (BioRAD) i en siliconebehandlet Pasteur pipette. Den gennemstrømmende væske og 450 µl af den efterføl-

gende vaskevæske hældes sammen. Der tilsættes 0,4 enheder kalvetarm alkalisk phosphatase (Boehringer). Efter inkubering i 1 time ved 37°C inaktiveres enzymet ved 65°C i 1,5 timer. NaCl-koncentrationen i inkubationsblandingen indstilles
 5 til 150 mM. Det lineariserede dephosphorylerede p31 DNA renses ved DE52 ionbytningskromatografi (se eksempel 5a)). Efter fældning med ethanol resuspenderes DNA'et i 10 mM Tris pH 8 ved en koncentration på 0,3 mg/ml.

c) Binding af lineariseret, dephosphoryleret p31 DNA til
 10 HaeIII-HpaI fragmenterne af IFN-5₁ DNA

0,6 µg dephosphoryleret p31 vektor DNA spaltet med BalI bindes til 0,5 µg partielle HaeIII-HpaI fragmenter af IFN-5₁ DNA (se eksempel 14a)). Bindingen gennemføres i 10 µl 60 mM Tris pH 7,5, 19 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 4 mM ATP og 300 enheder T4 DNA
 15 ligase (Biolabs) natten over ved stuetemperatur. En 1 µl af bindingsblandingen sættes til 50 µl calciumbehandlede transformeringskompetente Escherichi coli HB101 celler. Transformeringsmetoden er beskrevet i eksempel 4a.

Transformerede amp^R kolonier dyrkes hver for sig i LB medium
 20 indeholdende 100 µg/ml ampicillin. Der fremstilles plasmid DNA under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Holmes et al., (50), og de analyseres ved nedbrydning med restriktionsendonuklease BstEII (et entydigt sted i PHO5 promotoren).

20 Kloner indeholdende den indsatte IFN-5₁ del analyseres yderligere ved BstEII-EcoRI dobbelt nedbrydninger til bestemmelse af orienteringen og størrelsen af den indsatte del. Blandt 8 kloner med den indsatte del i den rigtige orientering findes alle tre forventede størrelser. Størrelsen svarer til de tre HaeIII₁₋₃-HpaI fragmenter dannet ved partiel HaeIII nedbrydning af IFN-5₁-genet (jfr. eksempel 14a)). Klonerne betegnes som p31/IFI(5₁), p31/IF2(5₁) og p31/IF3(5₁) med indsatte
 30 IFN-5₁ dele med henholdsvis 804 bp (HaeIII₁-HpaI), 780 bp (HaeIII₂-HpaI) og 699 bp (HaeIII₃-HpaI).

Eksempel 15.

Indføring af lymphoblastoid interferon-1'b DNA i plasmid p31 (se fig. 22)

a) Isolering af HaeIII-RsaI fragmenter af plasmid

5 CG-pBR322/HLycIFN-1'b:

10 µg CG-pBR322/HLycIFN-1'b (se eksempel 10E) nedbrydes med restriktionsnukleaser PstI og RsaI. Restriktionsfragmenterne separeres på en 0,8% lavtsmeltende agarosegel. Et PstI-RsaI fragment på 870 bp isoleres fra gelen og ren-
10 ses under anvendelse af den ovenfor beskrevne fremgangsmåde (eksempel 14a).

PstI-RsaI-fragmentet indeholder tre HaeIII-steder: ved position 13, 37 og 118 fra ATG'et i IFN-1'b kodningssekvensen. Ved partiel HaeIII-nedbrydning fås tre HaeIII-RsaI fragmen-
15 ter på henholdsvis 735 bp, 816 bp og 840 bp. Blandingen af fragmenter phenolekstraheres, hvorefter der foretages ethanol-fældning og resuspendering i 10 mM Tris pH 8,0 ved en koncentration på 0,1 mg/ml.

b) Binding af lineariseret, dephosphoryleret p31 DNA til

20 HaeIII-RsaI fragmenter af IFN-1'b DNA

0,6 µg dephosphoryleret p31 vektor DNA spaltet med BalI (se eksempel 14b) bindes til 0,5 µg partielle HaeIII-RsaI fragmenter af IFN-1'b DNA. Bindingsproceduren, transformationen af kompetente Escherichia coli HB 101-celler
25 med bindingsblandingen og udvælgelsen af de transformerede amp^R-kolonier gennemføres på samme måde som beskrevet i eksempel 14c. Plasmid DNA fremstilles under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Holmes et al. (50) og analyseres ved nedbrydning med restriktionsendonuklease BstEII.

30 7 kloner indeholdende den indsatte IFN-1'b-del analyseres ved hjælp af BstEII-PvuII-dobbelt nedbrydninger. To kloner

viser sig at indeholde HaeIII₂-RsaI fragmentet (816 bp) i den rigtige orientering. Denne konstruktion betegnes som p31/IF2(1'b).

Eksempel 16.

5 Indføring af lymphoblastoidt interferon-8₁' DNA i plasmid p31 (se fig. 23)

a) Isolering af et 1,46 kb SalI-EcoRI fragment af plasmid p3OIFN1(8₁')

5 µg p3OIFN1(8₁') DNA (se eksempel 5d) nedbrydes med restriktionsendonukleaser SalI og EcoRI. Et 1,46 kb SalI-EcoRI fragment indeholdende PHO5 promotoren bundet til protein-kodningsområdet af IFN-8₁' separeres på en 0,8% lavt-smeltende agarosegel. DNA-båndet lokaliseres ved farvning med ethidiumbromid og udskæres af gelen.

15 b) Isolering af et 3,5 kb SalI-EcoRI fragment af plasmid p31

5 µg p31 DNA (se eksempel 13d) nedbrydes fuldstændigt med restriktionsendonukleaser SalI og EcoRI. 3,5 kb vektorfragment indeholdende PHO5 transkriptionstermineringsssekvensen separeres på en 0,8% lavt-smeltende agarosegel, og DNA-båndet udskæres.

c) Binding af et 1,46 kb SalI-EcoRI fragment af p3OIFN1(8₁') til et 3,5 kb SalI-EcoRI fragment af p31

Gelblokke med 0,67 µg af 3,5 kb SalI-EcoRI fragmentet af p31 og 0,5 µg af 1,46 kb SalI-EcoRI fragmentet af p3OIFN1(8₁') bindes i 240 µl under anvendelse af den i eksempel 4a beskrevne fremgangsmåde ved 15°C natten over. 10 µl af bindingsblandingen anvendes til at transformere kompetente Escherichia coli HB101-celler.

Transformerede amp^R-kolonier dyrkes hver for sig i LB-medium

indeholdende 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA fremstilles under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Holmes et al. (50) og analyseres ved nedbrydning med restriktionsendonuklease BstEII (et entydigt sted i PHO5 promotoren). Et antal
 5 kloner indeholdende de indsatte IFN-8₁'-dele analyseres ved BstEII-PvuII-dobbeltnedbrydninger. De indeholder alle 1,46 kb SalI-EcoRI fragmentet. De identiske kloner betegnes som p31/IF(8₁').

Eksempel 17.

10 Underkloning af gen-konstruktioner i gærvektoren pJDB207 med højt kopital

Konstruktionerne beskrevet i eksempel 14-16 indeholder PHO5 promotoren, forskellige interferonkodningsområder og PHO5 transkriptionstermineringssignalerne i et tandemarrangement
 15 alle indsat i en pBR322 afledt vektor. Til kopiering i gær underklones hele indsætningsdelen såsom i gær-vektor pJDB207 (28), hvilket tillader udvælgelse af leucinprototrofe kolonier (jff. eksempel 9 og fig. 6).

2 µg af henholdsvis p31/IF(8₁') DNA, p31/IF1(5₁') DNA,
 20 p31/IF2(5₁') DNA, p31/IF3(5₁') DNA og p31/IF2(1'b) DNA nedbrydes med restriktionsendonuklease SalI og HindIII. Restriktionsfragmenterne adskilles på en præparativ 0,8% lavtsmeltende agarosegel. Det lille fragment (med en størrelse på ca. 2 kb) for hver nedbrydning udskæres af gelen.

25 10 µg pJDB207 DNA nedbrydes med restriktionsendonukleaser SalI og HindIII. Det store 6,2 kb fragment isoleres fra en præparativ 0,8% lavtsmeltende agarosegel. Gelblokke indeholdende DNA-fragmenterne smeltes ved 65°C og fortyndes med vand til formindskelse af agarosekoncentrationen til
 30 ca. 0,3%.

Hvert af 2 kb SalI-HindIII fragmenterne af plasmiderne

p31/IF(8₁'), p31/IF1(5₁), p31/IF2(5₁), p31/IF3(5₁) og p31/IF2(1'b) blandes med en ækvimolær mængde af 6,2 kb HindIII-salI fragment af pJDB207. Der gennemføres bindinger i 100 µl i 4 timer ved 15°C. 10 µl af hver enkelt bindingsblanding anvendes til at transformere kompetente Escherichia coli HB101-celler under anvendelse af den i eksempel 4a beskrevne fremgangsmåde. Adskillige amp^R-kolonier fra hvert forsøg dyrkes enkeltvis i LB-medium indeholdende 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA'et analyseres med hensyn til størrelsen af indsætningsdelen ved spaltning med restriktionsendonukleaser HindII og SalI. De dannede kloner med de korrekte indsætningsdele betegnes pJDB207/IF(8₁'), pJDB207/IF1(5₁), pJDB207/IF2(5₁) (jff. fig. 27), pJDB207/IF3(5₁) og pJDB207/IF2(1'b) (jff. fig. 27).

15

Eksempel 18.Transformering af Saccharomyces cerevisiae AH220 og inducering af interferon-produktion

Plasmider pJDB207/IF(8₁'), pJDB207/IF1(5₁), pJDB207/IF2(5₁), pJDB207/IF3(5₁) og pJDB207/IF2(1'b) indføres hver for sig i Saccharomyces cerevisiae stamme AH220 (a, trp1, leu2-3, leu2-112, his3, pho5, pho3) under anvendelse af transformeringsfremgangsmåden beskrevet af Hinnen et al. (1). Transformede gærceller udvælges på plader med minimalt gærmedium, som mangler leucin. Enkelte transformede gærkolonier udtages og dyrkes under anvendelse af den i eksempel 7 beskrevne fremgangsmåde. De enkelte gærkolonier betegnes på følgende måde:

Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207/IF(8₁'),
 Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207/IF1(5₁),
 30 Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207/IF2(5₁),
 Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207/IF3(5₁) og
 Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207/IF2(1'b).

Eksempel 19.Fremstilling af gærcelleekstrakter og bestemmelse af interferon-indholdet

Celleekstrakter fremstilles, og interferonaktiviteten bestemmes på samme måde som beskrevet i eksempel 8. Resultaterne er anført i nedenstående tabel 3.

Tabel 3.

Interferonaktivitet i *Saccharomyces cerevisiae* stamme AH220 efter transformering med følgende rekombinantplasmider:

10	Plasmider	Interferonaktivitet
		Enh./ml gærcelleekstrakt
	pJDB207/IF(8 ₁)	$1 \cdot 10^7$
	pJDB207/IF1(5 ₁)	$5 \cdot 10^5$
	pJDB207/IF2(5 ₁)	$5 \cdot 10^5$
15	pJDB207/IF3(5 ₁)	$3 \cdot 10^3$
	pJDB207/IF2(1'b)	$4 \cdot 10^3$

Eksempel 20.Kopiering af hepatitis B virus overflade (HBVs) antigen under kontrol af gær PHO5 promotoren

- 20 a) Konstruktion : af en fusion mellem PHO5 promotoren og HBVs protein-kodningsområdet

5 µg DNA fra plasmid pHBV130 (51) nedbrydes med restriktionsendonuklease *Ava*I som anbefalet af leverandøren (New England Biolabs). Der fås et fragment på 1336 basepar, som indeholder hele proteinkodningsområdet for HBVs, herunder 27 basepar af en potentiel præ-HBVs sekvens (se fig. 2 i ref. 51: *Ava*I fragmentet spænder over DNA segmentet fra Xho-ste-

det til et *Ava*I-sted 62 basepar efter *Bam*HI-stedet anbragt mellem overfladekodningsområdet og kernekodningsområdet). Fragmentet på 1336 basepar renses ved elektroforese på blød agarose (0,8% agarose-gel) under anvendelse af den i

5 eksempel 4a beskrevne fremgangsmåde.

5 µg plasmid pBR322/PHO5 *Bam*-Sal (se fig. 1) afskæres med restriktionsnukleaser *Sal*I og *Ava*I (position 1424 i pBR322), og det dannede 3,9 kb vektorfragment indeholdende pBR322 sekvenser sammen med PHO5 *Bam*-Sal segmentet renses ved elek-

10 troforese på blød agarose som beskrevet ovenfor.

1 µg af fragmentet på 1336 basepar bindes til 3 µg af 3,9 kb vektorfragmentet i 50 µl 60 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP og 600 enheder T4 DNA ligase (Biolabs) ved 15°C i 4 timer. Transformerings af *Escherichia coli* HB101

15 til ampicillinresistens og plasmidisolering gennemføres på samme måde som beskrevet i eksempel 4a.

Plasmidets korrekte struktur bekræftes ved restriktionsanalyse. Det således fremstillede nye plasmid betegnes pBR322/PHO5/HBVs (se fig. 24).

20 b) Justering af PHO5 promotoren til det eksakte HBVs proteinkodningsområde

Ved den beskrevne fusion dannes et DNA sekvensarrangement som vist i fig. 25. Sekvensdata tages fra fig. 3 (PHO5) og fra Pasek et al. (52, HBVs). nRNA initieringsstedet bestemmes ved konventionel S1 kortlægning (mapping) (48) under

25 anvendelse af *Bam*HI-Sal fragmentet af pBR322/PHO5 *Bam*-Sal (fig. 1). Til eliminering af PHO5 proteinkodningsområdet i pBR322/PHO5/HBVs nedbrydes 5 µg af plasmidet med restriktionsendonuklease *Kpn*I (betingelserne anført af leverandøren, New England Biolabs), hvorved der fås et lineariseret

30 plasmid.

4 µg lineariseret plasmid nedbrydes med 1 enhed exonuklease

Bal31 (Bethesda Research Laboratory) ved 30°C i 45 sekunder i 12 mM CaCl₂, 12 mM MgCl₂, 300 mM NaCl, 20 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8,1 i et samlet rumfang på 100 µl. Reaktionen afbrydes ved ekstraktion med phenol som beskrevet ovenfor.

- 5 Efter fældning med ethanol resuspenderes DNA'et i 50 µl TE.

- 1 µg DNA bibringes atter cirkelform ved binding med T4 DNA ligase i et rumfang på 20 µl (angående betingelser se eksempel 4a). Efter transformering af *Escherichia coli* HB101 til ampicillinresistens (se eksempel 4a) isoleres plasmid DNA som beskrevet, og de enkelte plasmidpræparater analyseres ved restriktionsanalyse med følgende enzymer: HaeIII, PstI, BstEII og HhaI. Denne analyse tillader bestemmelse af tilstedeværelsen af HhaI-stedet (6 basepar før starten af HBVs proteinkodningsområdet) og giver et mål for størrelsen af sletningen. DNA sekvensen i samlingsområdet bestemmes under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Maxam og Gilbert (15) (radioaktiv mærkning af BstEII-stedet i position ~374, se fig. 3). Slutpunkterne for sletningen dannet i et af plasmiderne er vist i fig. 24. Dette plasmid betegnes pBR322/PHO5/HBVsΔ14.
- 10
15
20

c) Overføring af PHO5-HBVs fusionen til gærplasmidet pJDB207
(se fig. 26)

- 5 µg DNA af plasmid pBR322/PHO5/HBVsΔ14 nedbrydes med restriktionsendonuklease BamHI (New England Biolabs, betingelserne er beskrevet af leverandøren). Et 1,8 kb BamHI fragment fremstilles ved elektroforese med blød agarosegel (0,8% agarose) under anvendelse af den i eksempel 4a beskrevne fremgangsmåde. 2 µg af gærvektoren pJDB207 nedbrydes med det samme enzym. 1 µg nedbrudt pJDB207 og 1 µg af 1,8 kb BamHI restriktionsfragmentet bindes i et samlet rumfang på 20 µl under anvendelse af de i eksempel 20a beskrevne betingelser. Transformering af *Escherichia coli* HB101 til ampicillinresistens og isolering af plasmid DNA gennemføres under anvendelse af den i eksempel 4a beskrevne fremgangsmåde. De
- 25
30
35

enkelte plasmider analyseres ved BamHI restriktionsanalyse, og orienteringen af det indsatte BamHI fragment bestemmes ved dobbeltnedbrydning med HindIII/BstEII. Konstruktionen er vist i fig. 26. Det dannede plasmid er vist i fig. 26
 5 og betegnes pJDB207/PHO5/HBVs Δ 14.

Plasmidet transformeres til gærstamme AH220 som beskrevet i eksempel 7. Transformerede gærceller udvælges, inkuberes i væskemedium og dyrkes under ikke-undertrykningsbetingelser under anvendelse af den i eksempel 7 beskrevne fremgangsmåde.
 10 måde. En enkelt transformeret gærkoloni betegnes *Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/HBVs Δ 14.

Fremstilling af celleekstrakt gennemføres under anvendelse af den i eksempel 8 beskrevne fremgangsmåde, og mængden af dannet HBVs protein bestemmes under anvendelse af Abbott
 15 radioimmunanalyse (51). Under forudsætning af, at HBVs-antigenet dannet af gær reagerer på samme måde som antigenet i humanserum, findes ca. 2 μ g HBVs-antigen pr. ml gærekstrakt under ikke-udslukningsbetingelser. Under slukningsbetingelser er indholdet mindre end 0,001 μ g/ml.

20 d) Overføring af PHO5-HBVs fusionen til et gærplasmid indeholdende en HPO5 transkriptionstermineringssekvens

5 μ g DNA fra plasmid pJDB207/IF(8₁) (eksempel 17) nedbrydes med BamHI som beskrevet ovenfor, og 6,9 kb vektordelen isoleres ved elektroforese på blødt agarose (0,8% agarose) under
 25 anvendelse af den i eksempel 4 beskrevne fremgangsmåde. 5 μ g pBR322/PHO5/HBVs Δ 14 nedbrydes med BamHI som beskrevet ovenfor, og 1,8 kb BamHI fragmentet isoleres ved elektroforese på blødt agarosegel. 1 μ g af 6,9 kb vektorfragmentet bindes med 1 μ g af 1,8 kb BamHI fragmentet i et samlet rumfang
 30 fang på 20 μ l under anvendelse af de i eksempel 20a beskrevne betingelser. Transformerings af *Escherichia coli* HB101 til ampicillinresistens og plasmidiosisring gennemføres under anvendelse af den i eksempel 4a beskrevne fremgangsmåde. Plasmidanalyse gennemføres ved hjælp af restriktions-

endonukleasenedbrydninger. Det dannede plasmid er vist i fig. 26 og betegnes pJDB207/PHO5/HBVs Δ 14. Transformation af gærstamme AH220 og udvælgelse af de transformerede celler gennemføres under anvendelse af den i eksempel 7 beskrevne fremgangsmåde. En enkelt transformeret gærkoloni betegnes *Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/HBVs Δ 14t.

Eksempel 21.

Hepatitis B virus (HBV) DNA sekvenser afskåret fra plasmider pBR322-PstI dG:HBV-KpnI dC,

10 pBR322-PstI dG:HBV-BamHI dC,
pBR322-PstI dG:HBV-BglII dC,
pBR322-PstI dG:HBV-EcoRI dC,
pBR322-BamHI: HBV-BamHI,
pBR322-EcoRI: HBV-EcoRI,

15 pBR322-PstI dG:HBV-KpnI dC,
pBR322-PstI' dG:pHBV114-PstI dC,
((pBR322-EcoRI HindIII: Lac promotorsekvens)-HindIII:HBV114-HhaI HindIII bindere)-BamHI,
pUR2-EcoRI: HBV114-HhaI EcoRI bindere,

20 pUR2-EcoRI: HBV114-HhaI EcoRI bindere
pBR322-PstI dG:pHBV114-AvaI dC, og
pBR322-PstI dG:pHBV114-Taq dC,

som beskrevet i beskrivelsen til europæisk patentansøgning 13828 kan indsættes (fortrinsvis efter passende tilpasning af enderne) i plasmider p30 eller p31 i overensstemmelse

25 med fremgangsmåden eksempel 5, 14 eller 15 og derefter i plasmid pJDB207 i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge eksempel 17. Transformerings af *Saccharomyces cerevisiae* gennemføres under anvendelse af den i eksempel 18 beskrevne fremgangsmåde. Kopiering af polypeptider, som udviser HBV antigenisitet, bestemmes under anvendelse af fremgangsmåden ifølge eksempel 20c.

30

Eksempel 22.

Sletning af 3' ikke-translaterede DNA sekvenser i plasmider pJDB207/IF2(5₁) og pJDB207/IF2(1'b) (se fig. 27 og 28)

Fremstillingen af plasmiderne pJDB207/IF2(5₁) og
5 pJDB207/IF2(1'b) (jf. eksempel 17) resulterer i dannelsen af et relativt langt 3' ikke-translateret område på henholdsvis ca. 440 bp og 480 bp. For at forkorte dette område i de fremstillede produkter nedbrydes DNA'et med exonuklease Bal31 fra et entydigt SmaI-sted i midten af dette
10 område. Xho bindere indføres, og DNA'et bringes på cirkulær form ved binding (ligation).

a) Bal31 nedbrydning af SmaI spaltede plasmider pJDB207/IF2(5₁) og pJDB207/IF2(1'b)

20 µg af de enkelte plasmid DNA'er nedbrydes med restriktionsendonuklease SmaI. Efter ekstraktion med phenol/chloroform fældes DNA'et med ethanol. DNA'et resuspenderes i 10 mM Tris pH 8,0 ved en koncentration på 0,5 mg/ml. 10 µg af de SmaI spaltede DNA'er nedbrydes hver for sig med to enheder endonuklease Bal31 (BRL) i 100 µl 20 mM Tris pH
15 8,00, 100 mM NaCl, 12 mM MgCl₂, 12 mM CaCl₂ og 1 mM EDTA. Alikvoter på 3 µg DNA udtages efter henholdsvis 90, 120 og 150 sekunders inkuberingstid ved 30°C og blandes straks med 50 µl phenol og 60 µl TNE. Efter ekstraktion med phenol/chloroform og fældning med ethanol resuspenderes DNA'et i
20 10 mM Tris pH 8,0 ved en koncentration på 100 µg/ml. Til analyse af den exonukleolytiske nedbrydning af Bal31 nedbrydes alikvoter af 0,7 µg DNA fra hvert tidspunkt med HindIII/EcoRI for pJDB207/IF2(5₁)-afledte prøver eller med PvuII/HindIII for pJDB207/IF2(1'b)-afledte prøver. Til
25 yderligere forsøg anvendes DNA'erne fra 90 sekunders tidspunktet.
30

b) Addition af XhoI bindere til de Bal31 behandlede DNA'er

2,2 µg af hver af plasmid DNA pJDB207/IF2(5₁) og pJDB207/IF2(1'b) inkuberes efter 90 nedbrydning i 90 sekunder med Bal31 (se eksempel 22a) i 1 time ved 37°C med 2,8 enheder
 5 Klenow DNA polymerase (stort fragment af polymerase I, BRL) i 35 µl 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂ og 0,1 mM dNTP's.

3 µg XhoI bindere 5'-CCTCGAGG-3', Collaborative Research) behandles med kinase i 50 µg 6mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 4 mM DTT, 0,5 mM ATP og 35 enheder T4 polynukleotidkinase
 10 (Boehringer) i 30 minutter ved 37°C.

0,67 µg kinasebehandlede XhoI bindere og 0,4 µg Bal31 behandlet DNA med korte ender af plasmid pJDB207/IF2(5₁) eller pJDB207/IF2(1'b) bindes natten over ved stuetemperatur i 25 µl 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 3,5 mM
 15 ATP og 450 enheder T4 DNA ligase. Det bunde DNA adskilles fra overskud af bindere ved fældning med isopropanol i nærværelse af 10 mM EDTA, 0,3 M natriumacetat pH 6,0 og 0,54 rumfang isopropanol. Efter inkubering i 35 minutter ved stuetemperatur afsættes DNA'et ved centrifugering.

20 Det fracentrifugerede materiale lufttørres og resuspenderes i 17 µl 6 mM Tris pH 7,9, 150 mM NaCl, 6 mM MgCl₂ og 6 mM mercaptoethanol. XhoI enderne bundet til DNA'et spaltes med XhoI, DNA'et fældes med isopropanol som beskrevet ovenfor og bringes på cirkulær form ved binding (ligation).

25 Efter en bindingstid på 6 timer ved 150°C i 50 µl 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP og 600 enheder T4 DNA ligase sættes 10 µl ligeringsblanding til 100 µl calcium-behandlede, transformeringskompetente Escherichia coli HB101-celler (se eksempel 4a).

30 72 transformerende amp^R-kolonier indeholdende plasmider med en IFN-5₁ indsat del dyrkes hver for sig i LB-medium indeholdende 100 mg/l ampicillin. Plasmid DNA analyseres ved nedbrydning med HaeIII. Restriktionsmønsteret muliggør be-

dømmelse af den omtrentlige størrelse af sletningen foretaget med Bal31. To kloner analyseres yderligere og afprøves for interferonaktivitet. De betegnes pJDB207/IF2(5₁)Δ72 og pJDB207/IF2(5₁)Δ82.

- 5 Nukleotidsekvensen på begge sider af den nye binding (XhoI binder) mellem det 3' ikke-translaterede område i IFN-5₁ genet og PH05 transskriptionstermineringsområdet er anført i fig. 28.

- 10 På tilsvarende måde dyrkes 60 amp^R kolonier indeholdende plasmider med en IFN-1'b indsat del hver for sig i LB medium indeholdende 100 mg/l ampicillin. Plasmid DNA analyseres som beskrevet ovenfor. En klon udvælges og afprøves for IFN-aktivitet. Den betegnes pJDB207/IF2(1'b)Δ.

Eksempel 23.

- 15 Fremstilling af rekombinant plasmider indeholdende flytbare IFN-5₁, -8₁ og -1'b cDNA indsætningsdele, som kan anvendes til direkte kopiering af fuldtudviklet lymfoblastoid IFN (se fig. 29 og 30).

a) Fremstilling af cDNA indsætningsdelene

- 20 cDNA indsætningsdelene afskæres fra rekombinant plasmiderne CG-pBR322/HLycIFN-8₁, CG-pBR322/HLycIFN-1'b, CG-pBR322/HLycIFN-5₁ ved nedbrydning af 150 µg plasmid DNA med PstI (Biolabs) under anvendelse af den af leverandøren anbefalede fremgangsmåde. Efter ekstraktion med phenol og fældning med
- 25 ethanol isoleres de afskårne indsætningsdele ved hjælp af saccharose-densitets-gradient-centrifugering (5-23%) i 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) og 1 mM EDTA. Centrifugeringen gennemføres ved 35.000 omdr./min. i en TST 41 rotor (Kontron AG) ved 15°C i 16 timer. Der opsamles 0,3 ml fraktioner med en
- 30 ISCO gradient kollektor ved 1 ml/min. Fraktionerne indeholdende det lille fragment (dvs. indsætningsdelen) hældes sam-

men. DNA'et fældes med ethanol på sædvanlig måde, og bundfaldet isoleres ved centrifugering i en HB-4 rotor (Sorvall) ved 10.000 omdr./min. ved 0°C i 10 minutter. Bundfaldet genopløses i 60 µl 19 mM Tris-HCl (pH 7,5) og 0,05 mM EDTA.

- 5 Der udvindes ca. 30 µg DNA bestemt ved måling af den optiske tæthed.

- 2 µg af hver af cDNA indsætningsdelene nedbrydes med 2,5 enheder Sau3A (Biolabs) i 10 µg/ml EtBr og inkuberes ved 37°C i 60 minutter. Nedbrydningsblandingerne ekstraheres med
10 phenol, og DNA'et fældes i ethanol som beskrevet ovenfor. DNA-fragmenterne fraktioneres på en 1,2% agarosegel i en opløsning indeholdende 50 mM Tris, 50 mM borsyre, 1 mM EDTA og 0,5 µg/ml ethidiumbromid.

- Det næststørste DNA-fragment (Sau 3A-PstI) fra hver af de
15 tre nedbrydninger udskæres fra gelen, sprøjtes gennem en tynd nål ved hjælp af en sprøjte over i 5 ml 0,15 M NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA og elueres natten over ved rystning. Eluatet ledes gennem en 100 µl DE-52 (Whatman) Pasteur-pipettesøjle til adsorbering af DNA'et. Søjlen vaskes
20 med 2 ml af den samme puffer, og DNA'et elueres med 400 µl af en opløsning indeholdende 1,5 M NaCl, 50 mM Tris (pH 8,0) og 1 mM EDTA. DNA'et fældes med 2 rumfang ethanol ved -20°C natten over. Bundfaldene isoleres ved centrifugering i en Eppendorf-centrifuge og genopløses i 10 µl 10 mM Tris.HCl
25 (pH 7,8), 0,05 mM EDTA.

b) Fremstilling af acceptor plasmid DNA-fragmentet

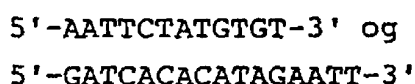
1. Nedbrydning af plasmid pBR322 med EcoRI og S₁

- 10 µg plasmid DNA pBR322 nedbrydes med 15 enheder EcoRI (Biolabs) i 60 minutter ved 37°C under de betingelser, som leverandøren anbefaler. Efter ekstraktion med phenol og fældning
30 med ethanol genopløses DNA'et i 25 µl H₂O og de forskudte eller enkeltstrengede ender fjernes ved behandling af DNA'et

- med 20 enheder endonuklease S_1 (P-L Biochemicals) i 350 μ l af en opløsning indeholdende 250 mM NaCl, 30 mM natriumacetat (pH 4,5), 1 mM $ZnSO_4$ ved 30°C i 30 minutter. Reaktionen afbrydes ved tilsætning af EDTA (pH 7,5) ved 10 mM.
- 5 DNA'et ekstraheres med phenol, koncentrerer ved fældning med ethanol og genopløses i 50 μ l 10 mM Tris.HCl (pH 7,8), 0,05 mM EDTA.

2. Binding af en kemisk syntetiseret DNA binder til pBR322 nedbrudt med EcoRI og S_1

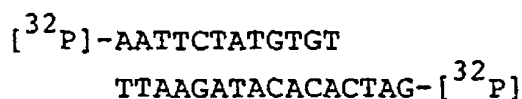
- 10 Der fremstilles to oligodeoxynukleotider med formelen



under anvendelse af den i eksempel 10 Ea beskrevne fremgangsmåde.

- 15 De syntetiske oligodeoxynukleotider phosphoryleres ved deres 5'-ender ved inkubering af 80 pmol af hver af oligodeoxynukleotiderne med 20 μ Ci [γ - 32 P]-ATP (6700 Ci.mmol⁻¹, Amersham) i en 80 μ l reaktionsblanding indeholdende 0,1 mM rATP (Sigma), 50 mM Tris.HCl (pH 9,5), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM DTT og 20 enheder
- 20 T_4 polynukleotid kinase (P-L Biochemicals) i 30 minutter ved 37°C. Reaktionen afbrydes ved frysning af blandingen ved -80°C.

Den dannede radioaktivt phosphorylerede binder med formelen



- 25 inkuberes derpå med 6 μ g pBR322 spaltet med EcoRI og S_1 (se ovenfor) i et reaktionsrumfang på 200 μ l indeholdende 9,5 mM rATP (Sigma), 0,1 mM DTT (Calbiochem), 20 mM Tris.HCl (pH 7,8), 10 mM $MgCl_2$ og 4×10^3 enheder T_4 DNA ligase (Biolabs) under inkubering af blandingen i 2 timer ved 15°C.

Opløsningen deproteiniseres ved ekstraktion med phenol, og DNA'et koncentrerer ved fældning med ethanol. DNA'et genopløses i 100 µl 19 mM Tris.HCl (pH 7,5), 0,05 mM EDTA og centrifugeres gennem en saccharosegradient (5-23%) i 50 mM

5 Tris.HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA. Centrifugeringen gennemføres ved 60.000 omdr./min. i en TST 60 rotor (Kontron AG) ved 15°C i 2,5 timer. Der udtages 0,2 ml fraktioner med en ISCO gradient opsamler med 1 ml/min. Fraktionerne indeholdende det [³²P]-mærkede plasmid DNA (fraktioner 11-14 ud af 22

10 fraktioner) hældes sammen, DNA'et fældes med ethanol og nedbrydes med 12 enheder BclI (Biolabs) som anbefalet af leverandøren. Efter ekstraktion med phenol og fældning med ethanol behandles det nedbrudt DNA med 10 enheder PstI (Biolabs) under anvendelse af den af leverandøren anbefalede fremgangsmåde.

15 Den phenolekstraherede nedbrydningsblanding centrifugeres derpå gennem en (5-23%) saccharose densitet gradient i 15 timer ved 35.000 omdr./min. ved 15°C i en TST 41 rotor (Kontron AG). Der udtages 0,3 ml fraktioner (se ovenfor), og fraktionerne indeholdende det store [³²P]-mærkede BclI-PstI

20 DNA-fragment (fraktioner 27-31 ud af 42 fraktioner) hældes sammen og koncentrerer ved fældning med ethanol. DNA'et genopløses i 20 µl Tris.HCl pH 7,8, 0,05 mM EDTA.

c) Binding af acceptor plasmid fragmentet til cDNA indsætningsdelene

25 2 µl af acceptor plasmid DNA-fragmentet (ca. 10 ng) (se ovenfor) inkuberes med 5 µl af hver af cDNA indsætningsdelene (ca. 20 ng) (se ovenfor) i et reaktionsrumfang indeholdende 20 mM Tris.HCl (pH 7,8), 10 mM MgCl₂, 0,1 mM rATP, 0,1 mM DTT og 400 enheder T₄ DNA ligase i 10 µl i 3 timer ved 15°C.

30 5 µl af reaktionsblandingerne sættes derpå til en blanding indeholdende 150 µl calcium-behandlet Escherichia coli HB 191 i 10 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂ og 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) i et samlet rumfang på 200 µl.

Blandingen afkøles i is i 20 minutter, opvarmes til 42°C i 1 minut og inkuberes ved 20°C i 10 minutter. 1 ml tryptonmedium (tryptonmedium indeholder 10 g Bacto-Trypton (Difco), 1 g gærekstrakt (Difco), 1 g glucose, 8 g NaCl og 294 mg CaCl₂ · 2 H₂O i 1 liter destilleret vand) tilsættes, og blandingen inkuberes i 30 minutter ved 37°C under omrystning ved 300 omdr./min. Blandingen overføres til to agarplader (McConkey agar, Difco, 0,6 ml pr. plade) tilsat 10 µg/ml tetracyclin (Sigma). Pladerne inkuberes ved 37°C i 12-17 timer. Der fås ca. 1000 kolonier pr. transformeringsblanding. Fire kolonier udtages fra hver transformeringsblanding til yderligere analyse.

d) Restriktionsanalyse af hybridplasmiderne

Med henblik på yderligere analyse af de potentielle hybrid plasmider isoleres plasmid DNA'et fra 12 kolonier (4 fra hver af de 3 bindingsblandinger, se ovenfor).

Hybrid plasmid DNA'et isoleres på følgende måde: 1 koloni anvendes til inokulering af 10 ml tryptonmedium tilsat 10 µg/ml tetracyclin som ovenfor i en 25 ml Erlenmeyerkolbe. Kulturen rystes i 15-18 timer ved 37°C ved 300 omdr./min. Cellerne isoleres ved filtrering (Sorvall, HS-4 røtor, 10 minutter ved 4000 omdr./min., 4°C). Der fås ca. 0,1 g celler, som resuspenderes i 1 ml 50 mM Tris.HCl (pH 8,0). Der tilsættes 0,25 ml lysozymopløsning (10 mg/ml i 50 mM Tris.HCl (pH 8,0), lysozymet er fra Sigma), og efter inkubering ved 0°C i 10 minutter tilsættes 0,15 ml 0,5 M EDTA (pH 7,5). Efter yderligere 10 minutters forløb ved 0°C tilsættes 60 µl 2% Triton X-100 (Merck). Efter 30 minutters forløb ved 0°C centrifugeres prøven i 30 minutter ved 15.000 omdr./min. og en temperatur på 4°C i en Sorval SA-600 rotor. Supernatanten deproteiniseres med 1 rumfang phenol (mættet med TNE). Faserne adskilles ved centrifugering (Sorval HB-4 rotor) i 10 minutter ved 5000 omdr./min. ved 4°C. Den øvre fase ekstraheres to gange med 1 rumfang chloroform. Der tilsættes RNase A udvundet fra pancreas (Sigma, 10 mg/ml med hensyn til TNE),

forvarmet i 10 minutter ved 85°C) til en slutkoncentration på 25 µg/ml, og blandingen inkuberes i 40 minutter ved 37°C. Derpå indstilles opløsningen til 1 M NaCl og 10% poly-ethylenglycol 6000 (Fluka, autoklaveret i 20 minutter ved 120°C), og der inkuberes ved -10°C i 2 timer. Bundfaldet isoleres i en Sorvall HB-4 rotor (20 minutter ved 10.000 omdrejninger pr. minut, 0°C) og genopløses i 100 µl TNE. DNA-opløsningen ekstraheres med 1 rumfang phenol, og DNA'et fældes med 2 rumfang ethanol ved -80°C i 10 minutter.

- 10 Bundfaldet isoleres ved centrifugering i en Eppendorf-centrifuge, og DNA'et genopløses i 20 µl 10 mM Tris.HCl (pH 7,5) og 0,5 mM EDTA. Fra 10 ml kultur udvindes 8-10 µg hybrid plasmid DNA.

- Alle plasmid DNA'erne analyseres ved hjælp af følgende dobbeltnekbrydninger: 0,5 µg DNA nedbrydes med HindIII (Biolabs) og PvuII (Biolabs), HindIII og PstI (Biolabs), HindIII og BamH_I (Biolabs), EcoRI (Biolabs) og PstI under anvendelse af standardfremgangsmåder, og der foretages fraktionering med hensyn til størrelse på en 1,5% agarosegel i 40 mM Tris. acetat (pH 7,8), 1 mM EDTA indeholdende 0,5 µg/ml EtBr.
- 15
 - 20

- Hybrid plasmiderne med de ønskede restriktionsenzymmønstre udvælges. Resultaterne er vist i fig. 29 og 30. Plasmid DNA indeholdende den indsatte del afledt af pBR322/HLycIFN-8₁ eller pBR322/HLycIFN-5₁ eller pBR322/HLycIFN-1'b betegnes henholdsvis CG-pBR322/HLycIFN(α-3)-252 og CG-pBR322/HLycIFN(α-2)-261 og CG-pBR322/HLycIFN(α-1)-258.
- 25

- For yderligere at bekræfte strukturen af samlingspunktet mellem binderen og begyndelsen af kodningssekvensen i IFN cDNA'erne, bestemmes nukleotidsekvensen i dette område.
- 30 2 µg af den isolerede plasmid DNA CG-pBR322/HLycIFN(α-1)-258 nedbrydes med EcoRI, mærkes i 5'-endestillingen og spaltes med PstI. DNA-fragmenterne fraktioneres på en 6% polyacrylamid-gel, og EcoRI*-PstI (9,4 bp) DNA-fragmentet ekstraheres som beskrevet ovenfor. DNA-fragmentet underkastes sekvens-

analyse under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Maxam og Gilberg (15).

Strukturen ved samlingspunktet mellem binderen og starten af kodningssekvensen i IFN cDNA'erne i plasmider

- 5 CG-pBR322/HLycIFN(α -2)-261 og CG-pBR322/HLycIFN(α -3)-252 bekræftes på tilsvarende måde.

I plasmiderne CG-pBR322/HLycIFN(α -1)-258, (α -2)-261 og (α -3)-252 findes der foran IFN kodningssekvenserne følgende nukleotidsegment indeholdende et EcoRI restriktionssted:

10 EcoRI Sau3A

 -NGAATTCTATGTGTGATC.....

 -NCTTAAGATACACACTAG.....

$\longleftrightarrow$

 IFN gen

Eksempel 24.

- 15 Sletning af PHO5 signalsekvensen i kopieringsplasmidet p31
(se fig. 31)

Kopieringplasmidet p31 indeholder PHO5 promotor sekvensen, som indbefatter mRNA startstederne, translationsstartcocon

20 ATG'et i sur phosphatase og yderligere 40 nukleotider, som koder for en del af sur phosphatase signalsekvensen. I denne konstruktion fjernes nukleotiderne for signalsekvensen og ATG'et ved nedbrydning med Bal31. EcoRI bindere indføres for at opnå binding af PHO5 promotoren til passende fuld-

25 ständige kodningssekvenser (f.eks. interferogener).

a) Bal31 nedbrydning af BalI spaltet plasmid p30

20 μ g p30 DNA (se eksempel 4b)) nedbrydes med restriktionsendonuklease BalI, hvorved der fås to fragmenter på henholds-

vis 3,7 og 5,1 kb. Efter ekstraktion med phenol/chloroform fældes DNA'et med ethanol. DNA'et resuspenderes i 10 mM Tris pH 8,0 ved en koncentration på 0,5 µg/ml. 9 µg BalI spaltet p30 DNA nedbrydes med 2 enheder exonuclease Bal31 (BRL) i

5 100 µl 20 mM Tris pH 8,0, 100 mM NaCl, 12 mM MgCl₂, 12 mM CaCl₂ og 1 mM EDTA. Alikvoter på 2 µg DNA udtages efter inkubering i henholdsvis 15 sekunder, 30 sekunder, 45 sekunder og 60 sekunder ved 30°C og blandes straks med 50 µl phenol og 60 µl TNE. Efter ekstraktion med phenol/chloroform

10 og fældning med ethanol resuspenderes DNA'et i 10 mM Tris pH 8,0 ved en koncentration på 100 µg/ml. Til analyse af udstrækningen af exonucleolytisk spaltning ved Bal31 nedbrydes 0,5 µg DNA fra de enkelte tidspunkter ved endonuklease BamHI og analyseres på en 1,5% agarosegel i Tris-borat-puffer

15 pH 8,3. I gennemsnit er 70 bp fjernet fra hver ende af fragmentet efter nedbrydning i 45 sekunder med Bal31. Til yderligere forsøg anvendes DNA, som har været behandlet i 45 sekunder.

b) Addition af EcoRI bindere til det Bal31-behandlede DNA

To A₂₆₀ enheder af EcoRI bindere (5'-GGAATTCC-3', BRL) resuspenderes i 250 µl 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA. 2 µg EcoRI bindere kinasebehandles i 75 µl 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 15 mM DDT, 10 µM ATP og 33 enheder T4 polynukleotid kinase (Boehringer) Efter 1 times forløb ved 37°C henstilles blandingen til afkøling ved stuetemperatur, hvorefter den opbevares ved -20°C.

De anellerede, dobbeltstrengede EcoRI bindere ligeres eller bindes med deres korte ender til det Bal31-behandlede DNA fragmenter. Et halv mikrogram Bal31-behandlede DNA (se eksempel 24a) inkuberes i 16 timer ved stuetemperatur med den 50-dobbelte mængde kinasebehandlede EcoRI bindere i 20 µl 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 4 mM ATP og 600 enheder T4 DNA ligase (Biolabs). Efter inaktivering af T4 DNA ligasen (10 minutter ved 65°C) spaltes overskuddet af EcoRI bindere med 50 enheder EcoRI (Boehringer) i et rumfang på 50 µl. DNA'et ekstraheres med phenol/chloroform, fældes med ethanol og resuspenderes i 10 mM Tris, 1 mM EDTA.

Restriktionsendonuklease EcoRI spalter ikke blot terminalt adderede EcoRI bindere i begge BalI fragmenter (3,7 kb og 5,1 kb), men også ved et indre EcoRI sted i 5,1 kb fragmentet, hvorved der dannes et 3,9 kb fragment og et 1,2 kb fragment. 3,7 kb og 3,9 kb fragmenterne adskilles fra 1,2 kb fragmentet på en 0,8% 's lavtsmeltende agarosegel (Sigma) i 90 mM Tris-HCl pH 8,3, 90 mM borsyre og 2,5 mM EDTA. DNA-båndene farves med ethidiumbromid og gøres synlige ved be-lysning med langbølget ultraviolet lys ved 366 nm. De to DNA fragmenter på 3,7 kb og 3,9 kb er ikke adskilt. De udskæres af gelen i en enkelt gelblok og ekstraheres under anvendelse af den i eksempel 4a beskrevne fremgangsmåde.

De lineære fragmenter, der afsluttes i EcoRI klæbrige ender, bringes på cirkulær form ved binding. Ca. 0,25 µg fragmenter bindes i 100 µl 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP og 600 enheder T4 DNA ligase i 4 timer ved

15°C.

10 µl alikvoter af bindingsblandingen sættes til 100 µl calciumbehandlede, transformationskompetente Escherichia coli HB101 celler (se eksempel 4a). 35 transformerede, amp^R kolonier dyrkes hver for sig i LB medium indeholdende 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA fremstilles under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Holmes et al., (50) og analyseres ved dobbeltnedbrydning med EcoRI/BamHI.

c) Nukleotidsekvensanalyse til bestemmelse af stillingen af EcoRI binderadditionen

Størsteparten af de 35 kloner vil afvige indbyrdes med hensyn til stillingen af EcoRI binderaddition i i pHO5 promotorområdet afhængigt af graden af Bal31 nedbrydning i de enkelte DNA molekyler. Med henblik på nukleotidsekvensanalyse nedbrydes plasmid DNA med EcoRI. Efter ekstraktion med phenol/chloroform fældes det spaltede DNA med ethanol. Der foretages dephosphorylering og 5'-terminalmarkering af DNA'et under anvendelse af den i eksempel 10Ed beskrevne fremgangsmåde. De mærkede DNA fragmenter spaltes med en anden restriktionsendonuklease, BamHI. Produkterne adskilles på en 0,8% lavtsmeltende agarosegel. Det 0,5-0,6 kb 5'-mærkede EcoRI-BamHI fragment isoleres fra lavtsmeltende agarose under anvendelse af den i eksempel 4a beskrevne fremgangsmåde. Til bestemmelse af nukleotidsekvensen i nabostilling til EcoRI binderen nedbrydes de forskellige DNA fragmenter kemisk, og produkterne adskilles ved polyacrylgelelektroforese som beskrevet af Maxam og Gilbert (15).

De forskellige kloner og positionen for det tilsvarende sidste nukleotid i PHO5 sekvensen (derefter efterfulgt af en EcoRI binder) er anført i nedenstående tabel 4 (se også fig. 32).

Tabel 4

Klon	position af sidste nukleotid i PHO5 sekvensen
pE	+25
pG	+16
5 pe	+15
pd	+12
pY	- 4
pR	-10
pP	-16
10 pV	-18
pL	-21
pN	-22
pC	-24
pH	-27
15 pS	-28
pk	-29
pl	-38
pM	-50
pO	-53
20 pF	-59
pm	-67
pK	-73
pi	-81
ph	-137

- 25 d) Isolering af et 0,53 kb BamHI-EcoRI fragment indeholdende PHO5/R promotoren:

Plasmid pR indeholder PHO5/R promotoren på et 534 bp BamHI-EcoRI fragment. I overensstemmelse med den i fig. 3 anførte nummerering dækker fragmentet PHO5 promotorsekvenserne fra
 30 nukleotid -541 (BamHI sted) til nukleotid -10. En EcoRI binder, bundet til nukleotid -10 (se eksempel 24b) bidrager til 2 G-rester efter EcoRI spaltning.

Plasmid pR nedbrydes med restriktionsendonukleaser BamHI og EcoRI. 0,53 kb BamHI-EcoRI fragmentet separeres på en 0,8%
 35 lavtsmeltende agarosegel og isoleres under anvendelse af den i eksempel 4a beskrevne fremgangsmåde. Nukleotidsekvensen er anført i fig. 33.

På analog måde nedbrydes plasmid pY, og der isoleres et 0,53 kb BamHI-EcoRI fragment indeholdende PH05/Y promotoren. Nukleotidsekvensen er anført fig. 34.

- e) Ombytning af Sali-EcoRI fragmentet plasmid p31 med
5 et Sali-EcoRI fragment af de hidtil ukendte konstruk-
tioner
- 5 µg plasmid p31 (jfr. eksempel 13d) nedbrydes med restriktionsendonuklease Sali. Det spaltede DNA fældes med ethanol og resuspenderes i 50 µl 100 mM Tris pH 7,5, 50 mM NaCl,
10 5 mM MgCl₂. DNA'et nedbrydes fuldstændigt med EcoRI. Restriktionsfragmenterne adskilles på en 0,8% lavtsmeltende agarosegel i Tris-borat-EDTA-puffer pH 8,3. Et 3,5 kb DNA fragment isoleres i en lille gelblok indeholdende DNA båndet.
- 15 5 µg af hver af klonerne pR og pY (jfr. tabel 4 og fig. 32) nedbrydes med Sali og EcoRI på samme måde som beskrevet ovenfor. 0,8 kb DNA fragmenterne isoleres i små blokke af lavtsmeltende agarosegel.
- 20 0,67 µg af 3,5 kb Sali-EcoRI fragmentet af vektor p31 bindes til 0,34 µg af 0,8 kb Sali-EcoRI fragmentet af henholdsvis plasmid pR eller pY. Passende gelblokke indeholdende DNA fragmenterne blandes og smeltes ved 65°C. Den flydende gel fortyndes tre gange. Der foretages binding i et samlet rumfang af 240 µl 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM
25 DTT, 1 mM ATP med 750 enheder T4 DNA ligase (Biolabs) natten over ved 15°C. 2 µl alikvoter af hver af blandingerne sættes til 100 µl calciumbehandlede, transformationskompetente Eschericia coli HB101 celler (se eksempel 4a).
- 30 8 transformerede amp^R kolonier dyrkes hver for sig i LB-medium indeholdende 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA analyseres ved restriktionsanalyse. Klonerne i hver gruppe er identiske. En klon for hver gruppe anvendes i det efterfølgende og betegnes som henholdsvis p31/R eller p31/Y (fig. 31).

Eksempel 25

Indføring af lymphoblastoidt interferon- α -3- DNA i plasmid p31/R eller p31/Y (jfr. fig. 35)

Denne konstruktion forbinder PHO5 promotorområdet til ge-
 5 net, som koder for færdig udviklet interferon- α -3. Hverken
 signalsekvenserne i PHO5 eller interferon er til stede,
 men der findes en EcoRI binder, som er indført på sam-
 lingsstedet.

Plasmid p31/R (se eksempel 24e) indeholder PHO5 promotor-
 10 sekvensen, som afsluttes 9 nukleotider før ATG'et i sur
 phosphatase genet med en EcoRI binder 5'-GGAATTC-3'. Det
 lymphoblastoide interferon- α -3 gen i plasmid CG-pBR322/HLyc
 IFN(α -3)-252 (se eksempel 23) er specifikt tilpasset til
 samlingen til EcoRI binderen i PHO5 promotoren. De yder-
 15 ligere nukleotider ved 5'-enden i kodningssekvensen i
 fuldt udviklede interferon- α -3 giver et EcoRI restriktions-
 sted og et ATG, som er nødvendigt for transpositionen af
 interferongenet (jfr. fig. 29). Stort set samme konstruk-
 tion gennemføres også ved plasmid p31/Y (se eksempel 24e).

20 a) Fremstilling af EcoRI-spaltet, dephosphoryleret plasmid
p31/R

5 μ g plasmid p31/R nedbrydes fuldstændigt med restriktions-
 endonuklease EcoRI (Boehringer). Efter ekstraktion med
 phenol/chloroform fældes DNA'et med ethanol og resuspen-
 25 deres i 100 μ l 50 mM Tris pH 8,0. DNA'et ledes gennem
 Chelex 100 (BioRAD), dephosphoryleres med kalvetarm alka-
 lisk phosphatase (Boehringer), og det dephosphorylerede
 DNA renses ved DE52 ionbytterkromatografi som beskrevet
 i eksempel 14b. DNA'et resuspenderes i 10 mM Tris.HCl
 30 pH 7,5, 1 mM EDTA ved en koncentration på 0,2 mg/ml.

b) Isolering af et 0,6 kb EcoRI fragment af plasmid
 CG-pBR322/HLycIFN(α -3)-252 indeholdende IFN- α -3 kod-
ningssekvensen

10 μ g plasmid G-pBR322/HLycIFN(α -3)-252 nedbrydes med re-
 35 striktionsendonuklease EcoRI. Nedbrydningen resulterer i

to fragmenter på 3,8 kb og 0,6 kb. 0,6 kb fragmentet indeholder området, som koder for interferon- α -3. Fragmentet isoleres på en 0,6% lavtsmeltende agarosegel i Tris-borat-EDTA-puffer. Gelstykket indeholdende 0,6 kb DNA fragmentet

5 tet udskæres af gelen og anvendes til binding.

c) Binding af lineariseret dephosphoryleret p31/R DNA og
 0,6 kb EcoRI fragmentet af IFN- α -3 DNA

1,5 μ g dephosphoryleret p31/R vektor DNA spaltet med EcoRI bindes til 0,19 μ g af 0,6 kb EcoRI fragmentet af IFN- α -3.

10 Sidstnævnte fragment er indeholdt i en lille blok lavtsmeltende agarosegel, som smeltes ved 65°C. Den smeltede gel fortyndes to gange. Der foretages binding i et samlet rumfang af 220 μ l 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP med 800 enheder T4 DNA ligase (Biolabs)

15 natten over ved 15°C. En 10 μ l alikvot af bindingsblandingen sættes til 100 μ l calciumbehandlede transformationskompetente Eschericia coli HB101 celler (se eksempel 4a).

6 transformerede amp^R kolonier dyrkes hver for sig i LB medium indeholdende 100 μ g/ml ampicillin. Plasmid DNA

20 fremstilles under anvendelse af fremgangsmåden ifølge Holmes et. al., (50), og analyseres ved dobbeltbrydninger med BglII/BstEII til bestemmelse af orienteringen og størrelsen af den indsatte del. En af disse kloner betegnes p31R/IF(α -3).

25 Den samme konstruktion gennemføres med p31/Y (se eksempel 24e). Plasmider fra 6 transformerede amp^R kolonier analyseres. 2 kloner har den rigtige orientering af den indsatte del. En af disse betegnes p31Y/IF(α -3).

Eksempel 26

30 Indføring af lymphoblastoid interferon- α -2 DNA i plasmid p31/R (se fig. 36)

Denne konstruktion forbinder PHO5 promotoren til det fuldt udviklede interferon- α -2 kodningsområde.

a) Isolering af et 3,9 kb HindIII-EcoRI fragment af vektor p31/R

10 µg af vektor p31/R nedbrydes fuldstændigt med HindIII. Pufferen indstilles med 0,1 rumfang 1 M Tris pH 7,5. Det
5 HindIII-spaltede p31/R DNA nedbrydes derpå med EcoRI. 3.9 kb HindIII-EcoRI fragmentet isoleres fra en 0,8% lavtsmeltende agarosegel i en gelblok udskåret af gelen.

b) Isolering af et 0,9 kb XbaI-HindIII fragment af pJDB207/IF2(5₁)

10 5 µg plasmid pJDB207/IF2(5₁) (jfr. eksempel 17) nedbrydes fuldstændigt med HindIII. Pufferen indstilles med 0,1 rumfang 1 M Tris pH 7,9. Det HindIII-spaltede plasmid nedbrydes derpå med XbaI. 0,9 kb XbaI-HindIII fragmentet indeholder en del af interferon-α-2-kodningssekvensen og ned-
15 strøms PHO5 transskriptionstermineringssignalerne. 0,9 kb fragmentet separeres på en 0,8% lavtsmeltende agarosegel og udskæres af gelen.

c) Isolering af et 252 bp EcoRI-XbaI fragment af plasmid CG-pBR322/HLycIFN(α-2)-261 indeholdende en del af IFN-α-2-kodningssekvensen

10 µg plasmid CG-pBR322/HLycIFN(α-2)-261 (se eksempel 23) nedbrydes med XbaI i 100 µl 6 mM Tris pH 7,9, 150 mM NaCl, 6 mM MgCl₂ og 6 mM mercaptoethanol. Efter fuldstændig nedbrydning med XbaI nedbrydes det lineariserede plasmid DNA
25 delvis med 3 enheder EcoRI (Boehringer). Efter 20 minutter ved 37°C afbrydes nedbrydningen ved nedfrysning til -70°C. DNA fragmenterne analyseres på en 1,5% agarosegel i Tris-borat-EDTA-puffer pH 8,3. 252 bp EcoRI-XbaI fragmentet indeholder 5'-delen af den fuldstændige interferon-α-2-
30 kodningssekvens (op til XbaI stedet) med den specifikke binder for samlingen med PHO5 promotoren. 252 bp fragmentet isoleres i en lille gelblok fra en 0,8% lavtsmeltende agarosegel.

d) Binding af DNA fragmenter

35 3 DNA fragmenter beskrevet i eksempel 26a-c med passende

klæbrige ender bindes i én reaktion:

- 0,67 µg af 3,9 kb HindIII-EcoRI fragmentet af vektor p31/R,
 0,16 µg af 0,9 kb XbaI-HindIII fragmentet af pJDB207/IF2(5₁)
 og ca. 70 ng 250 bp EcoRI-XbaI fragmentet af CG-pBR322/
 5 HlycIFN(α-2)-261 bindes. Alle tre DNA fragmenter er inde-
 holdt i små gelblokke af lavtsmeltende agarose. De tre
 stykker agarosegel anbringes sammen, smeltes ved 65°C og
 fortyndes tre gange. Bindingen gennemføres i samlet rum-
 fang af 450 µl 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT,
 10 1 mM ATP med 1200 enheder T4 ligase ved 15°C i 16 timer.
 En 10 µl alikvot af bindingsblandingen sættes til 100 µl
 calciumbehandlede transformationskompetente Escherichia
 coli HB101 celler (se eksempel 4a).

- 12 transformerede amp^R kolonier dyrkes hver for sig i LB
 15 medium indeholdende 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA frem-
 stilles i overensstemmelse med fremgangsmåden ifølge
 Holmes et.al. (50), og analyseres ved dobbelt nedbrydning
 med BamHI/HindIII. Alle kloner udviser et identisk nedbryd-
 ningsmønster. En af dem betegnes p31R/IF(α-2).

- 20 I stedet for 0,9 kb XbaI-HindIII fragmentet af pJDB207/
 IF2(5₁) kan der anvendes et 0,5 kb XbaI-HindIII fragment af
 plasmid pJDB207/IF2(5₁)Δ72 eller pJDB207/IF2(5₁)Δ82 (se
 eksempel 22) til bindingen. Endvidere kan der i stedet for
 3,9 kb HindIII-EcoRI fragmentet af vektor p31/R til bin-
 25 ding en anvendes 3,9 kb HindIII-EcoRI fragmentet af vektor
 p31/Y.

Betingelser for binding af DNA fragmenterne og transforma-
 tionen af Escherichia coli HB101 er de samme som beskrevet
 ovenfor.

- 30 12 transformerede amp^R kolonier fra hver binding dyrkes
 hver for sig i LB medium indeholdende 100 µg/ml ampicillin.
 Plasmid DNA analyseres ved dobbelt nedbrydning med BamHI/
 HindIII. De dannede kloner betegnes p31R/IF(α-2)Δ72,
 p31R/IF(α-2)Δ82, p31Y/IF(α-2), p31Y/IF(α-2)Δ72 og p31/IF(α-2)Δ82.

Eksempel 27

Indføring af lymphoblastoidt interferon- α -1 i plasmid
p31/R (se fig. 37)

- 5 a) Isolering af 3,9 kb HindIII-EcoRI fragment af vektor
p31/R:
- 10 μ g af vektor p31/R nedbrydes med HindIII og EcoRI som
beskrevet i eksempel 26a. De dannede 0,4 kb og 3,9 kb frag-
menter adskilles på en præparativ 0,8% lavtsmeltende aga-
rosegel. 3,9 kb HindIII-EcoRI fragmentet elueres fra gelen
10 under anvendelse af den i eksempel 4a beskrevne fremgangs-
måde. DNA'et renses ved DE52 (Whatman) ionbytningskroma-
tografi (se eksempel 5a), fældes med ethanol og resuspen-
deres i 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA i en koncentration
på 0,1 mg/ml.
- 15 b) Isolering af 0,9 kb PvuII-HindIII fragment af pJDB207/
IF2(1'b):
- 5 μ g plasmid pJDB207/IF2(1'b) (jfr. eksempel 17) nedbrydes
med PvuII og HindIII. De dannede fragmenter på 0,9 kb og
7,3 kb adskilles på en præparativ 0,8% lavtsmeltende
20 agarosegel. 0,9 kb fragmentet elueres fra gelen og renses
under anvendelse af den i eksempel 27a beskrevne fremgangs-
måde. DNA'et resuspenderes i 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA
i en koncentration på 0,05 mg/ml.
- 25 c) Isolering af et 286 bp EcoRI-PvuII fragment af plasmid
CG-pBR322/HLycIFN(α -1)-258 indeholdende en del af
IFN- α -1 kodningssekvensen
- 30 10 μ g plasmid CG-pBR322/HLycIFN(α -1)-258 (se eksempel 23)
nedbrydes med PvuII og EcoRI. Et 286 bp restriktionsfragment
adskilles fra et 4,2 kb fragment på en præparativ 0,8% lavt-
smeltende agarosegel. 286 bp EcoRI-PvuII fragmentet elueres
fra gelen og renses under anvendelse af den i eksempel 27a
beskrevne fremgangsmåde. DNA'et resuspenderes i 10 mM Tris
pH 8,0, 1 mM EDTA i en koncentration på 0,03 mg/ml.

d) Binding af DNA-fragmenter

- 0,5 µg af 3,9 kb HindIII-EcoRI fragmentet af vektor p31/R,
 0,25 µg af 0,9 kb PvuII-HindIII fragmentet af pJDB207/IF2(1'b)
 og 0,1 µg af 286 bp EcoRI-PvuII fragmentet af plasmid
- 5 CG-pBR322HLycIFN(α-1)-258 bindes i 16 timer ved 15°C i 20 µl
 60 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 5 mM ATP og 600
 enheder DNA ligase. En 3 µl alikvot af bindingsblandingen
 sættes til 100 µl calciumbehandlede, transformationskompeten-
 te Escherichia coli HB101 celler (se eksempel 4a)).
- 10 12 transformerede, amp^R kolonier dyrkes hver for sig i LB
 medium med 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA analyseres ved
 dobbeltnekbrydning med BamHI/HindIII. En klon, som fremkal-
 der et 1,4 kb BamHI fragment og et 390 bp BamHI-HindIII frag-
 ment, analyseres yderligere og betegnes p31R/IF(α-1).
- 15 3,9 kb HindIII-EcoRI fragmentet af vektor p31/R kan ombyttes
 med HindIII-EcoRI fragmentet af vektor p31/Y. I stedet for
 0,9 kb PvuII-HindIII fragmentet af pJDB207/IF2(1'b) kan der
 anvendes et 0,45 kb PvuII-HindIII fragment af
 pJDB207/IF2(1'b)Δ til bindingen. De dannede kloner analyseres
- 20 på samme måde som beskrevet ovenfor. Klonerne betegnes
 p31R/IF(α-1)Δ , p31Y/IF(α-1) og p31Y/IF(α-1)Δ.

Eksempel 28.

Underkloning af genkonstruktioner i gærvektoren pJDB207 i
 højt kopiantal (se fig. 38).

- 25 Konstruktionerne beskrevet i eksempel 25-27 indeholder PHO5
 promotoren, forskellige interferon kodningsområder og PHO5
 transskriptionsterminalsignalerne i et tandemarrangement,
 alle indsat i en pBR322-afledt vektor. Sali-HindIII fragmen-
 ter indeholdende hele arrangementet bindes til 6,2 kb Sali-
- 30 HindIII fragmentet af pJDB207 under anvendelse af den eksem-
 pel 17 beskrevne fremgangsmåde.

2 µg plasmid p31R/IF(α-3) nedbrydes med restriktionsendonukleaser SalI og HindIII. Restriktionsfragmenterne adskilles på en præparativ 0,8% lavt smeltende agarosegel. Det lille fragment (størrelse på 1,8 kb) udskæres af gelen.

- 5 Plasmid pJDB207 nedbrydes med restriktionsendonukleaser SalI og HindIII, og den største fragment på 6,2 kb isoleres under anvendelse af den i eksempel 17 beskrevne fremgangsmåde.

- Binding af DNA-fragmenterne og transformation af kompetente Escherichia coli HB101 celler gennemføres ved anvendelse af den i eksempel 17 beskrevne fremgangsmåde. 8 amp^R kolonier dyrkes hver for sig i LB medium indeholdende 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA'et analyseres med hensyn til størrelsen af den indsatte del ved spaltning med restriktionsendonukleaser HindIII og SalI. En klon med den korrekte indsatte del udvælges og betegnes pJDB207R/IF(α-3).

- På tilsvarende måde, idet man starter ud fra plasmiderne p31Y/IF(α-3), p31R/IF(α-2), p31R/IF(α-2)Δ72, p31R/IF(α-2)Δ82, p31Y/IF(α-2), p31Y/IF(α-2)Δ72, p31Y/IF(α-2)Δ82, p31R/IF(α-1), p31R/IF(α-1)Δ, p31Y/IF(α-1) og p31Y/IF(α-1)Δ, fremstilles
- 20 nedenstående kloner med korrekte indsatte dele:

- pJDB207Y/IF(α-3),
 pJDB207R/IF(α-2),
 pJDB207R/IF(α-2)Δ72,
 pJDB207R/IF(α-2)Δ82,
25 pJDB207Y/IF(α-2),
 pJDB207Y/IF(α-2)Δ72,
 pJDB207Y/IF(α-2)Δ82,
 pJDB207R/IF(α-1),
 pJDB207R/IF(α-1)Δ,
30 pJDB207Y/IF(α-1) og
 pJDB207Y/IF(α-1)Δ.

Eksempel 29.Transformation af *Saccharomyces cerevisiae* AH220 og induktion af interferonproduktion

- Plasmider pJDB207/IF2(5₁)Δ72, pJDB207/IF2(5₁)Δ82,
 5 pJDB207/IF2(1'b)Δ, pJDB207R/IF(α-3), pJDB207Y/IF(α-3),
 pJDB207R/IF(α-2), pJDB207R/IF(α-2)Δ72,
 pJDB207R/IF(α-2)Δ82, pJDB207Y/IF(α-2), pJDB207Y/IF(α-2)Δ72,
 pJDB207Y/IF(α-2)Δ82, pJDB207R/IF(α-1), pJDB207R/IF(α-1)Δ,
 pJDB207Y/IF(α-1) og pJDB207Y/IF(α-1)Δ (se henholdsvis eksem-
 10 pel 22 og 28) indføres hver for sig i *Saccharomyces cerevi-*
siae stamme AH220 (a, trp1, leu2-3, leu2-112, his3, pho5,
 pho3) under anvendelse af transformationsmetoden beskrevet
 af Hinnen et al. (1). Transformerede gærceller udvælges på
 gærminimalmediumplader, som mangler leucin. Enkelte transfor-
 15 merede gærkolonier udtages og dyrkes under anvendelse af den
 i eksempel 7 beskrevne fremgangsmåde. De forskellige gærkolo-
 nier betegnes på følgende måde:
- Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/IF2(5₁)Δ72,
Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207/IF2(5₁)Δ82,
 20 *Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207/IF2(1'b)Δ,
Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207R/IF(α-3),
Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207Y/IF(α-3),
Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207R/IF(α-2),
Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207R/IF(α-2)Δ72,
 25 *Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207R/IF(α-2)Δ82,
Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207Y/IF(α-2),
Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207Y/IF(α-2)Δ72,
Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207Y/IF(α-2)Δ82,
Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207R/IF(α-1),
 30 *Saccharomyces cerevisiae* AH220/pJDB207R/IF(α-1)Δ,
Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207Y/IF(α-1) og
Saccharomyces cerevisiae AH220/pJDB207Y/IF(α-1)Δ

Eksempel 30.Transformation af Saccharomyces cerevisiae stamme GRF18
og induktion af interferonproduktion

Analogt med fremgangsmåden beskrevet i eksempel 29 transfor-
 5 meres *Saccharomyces cerevisiae* stamme GRF18 (α , his3-11,
 his3-15, leu2-3, leu2-112, can^R) med plasmiderne anført
 i eksempel 29. De forskellige gærkolonier betegnes på føl-
 gende måde:

- Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/IF2(5₁) Δ 72,
 10 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/IF2(5₁) Δ 82,
 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207/IF2(1'b) Δ ,
 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207R/IF(α -3),
 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207Y/IF(α -3),
 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207R/IF(α -2),
 15 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207R/IF(α -2) Δ 72,
 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207R/IF(α -2) Δ 82,
 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207Y/IF(α -2),
 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207Y/IF(α -2) Δ 72,
 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207Y/IF(α -2) Δ 82,
 20 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207R/IF(α -1),
 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207R/IF(α -1) Δ ,
 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207Y/IF(α -1) og
 Saccharomyces cerevisiae GRF18/pJDB207Y/IF(α -1) Δ .

Eksempel 31.

- 25 Fremstilling af gærcelleekstrakter og bestemmelse af inter-
 feronkoncentrationen

Celler fra 50 ml dyrkningsmedium med en celletæthed på
 1-2 x 10⁷/ml samles ved centrifugering i en Sorval GSA rotor
 i 10 minutter ved 3000 omdrejninger pr. minut. Celler resuspen-
 30 deres i 2ml 0,1 M KH₂PO₄ pH 7,4, og centrifugeres ved stue-
 temperatur i 5 minutter ved 3000 omdr./min. Det udfældede
 celler resuspenderes i 1,2 ml iskold lyseringsblanding

- [0,1 M kaliumphosphatpuffer pH 7,4, 1% (rumfang/rumfang) Triton X-100, 0,1 mM PMSF (Merck)] og overføres til et 30 ml Corex-rør. 1,6 g glasperler (0,4 mm i diameter) sættes til cellerne, og suspensionen rystes på et hvirvelblendeapparat (Scientific Instruments Inc., USA) med fuld hastighed i 30 sekunder, hvorefter der afkøles i 1 minut i et isbad. Denne omrystningsmetode gentages 5-10 gange, indtil mere end 90% af cellerne er blevet nedbrudt (kontrol under lysmikroskop).
- 10 Cellerester og glasperler fjernes fra opløsningen ved centrifugering i 10 minutter ved 8000 omdr./min. ved 4°C i en Sorvall HB-4 rotor. Supernatanten overføres til Eppendorf-rør, som fryses i flydende nitrogen og opbevares ved -60°C. Interferonaktiviteten bestemmes under anvendelse af metoden
- 15 ifølge Armstrong (32) samt under anvendelse af humane CCL-23 celler og vesikulær stomatitis virus (VSV) som challenger viruset. Resultaterne er anført i tabel 5.
- Interferonaktiviteten i *Saccharomyces cerevisiae* stamme AH220 og GRF18 efter transformeringen med et rekombinant plasmid
- 20 er stort set identisk. Tabel 6 viser en sammenligning af interferonaktiviteterne hos begge stammer efter transformering med de som eksempler anførte plasmider.

Tabel 5

Interferonaktivitet i *Saccharomyces cerevisiae* stamme AH220 efter transformering med følgende rekombinant plasmider:

5	Plasmider	Eksem- pel	Interferonaktivitet udtrykt i	
			enh./ml gærcele- leekstrakt	enh./l gærcelle- kultur
	pJDB207/IF(8' ₁)	17	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
	pJDB207R/IF(α -3)	28	$1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$
	pJDB207Y/IF(α -3)	28	$1 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^9$
10	pJDB207/IF1(5' ₁)	17	$7 \cdot 10^5$	$1.4 \cdot 10^7$
	pJDB207/IF2(5' ₁)	17	$5 \cdot 10^5$	$1.0 \cdot 10^7$
	pJDB207/IF3(5' ₁)	17	$3 \cdot 10^3$	$6.3 \cdot 10^4$
	pJDB207/IF2(5' ₁) Δ 72	22	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^7$
	pJDB207/IF2(5' ₁) Δ 82	22	$5 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^7$
15	pJDB207R/IF(α -2)	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
	pJDB207R/IF(α -2) Δ 72	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
	pJDB207R/IF(α -2) Δ 82	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
	pJDB207Y/IF(α -2)	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
	pJDB207Y/IF(α -2) Δ 72	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
20	pJDB207Y/IF(α -2) Δ 82	28	$1 \cdot 10^7$	$2 \cdot 10^8$
	pJDB207/IF2(1' _b)	17	$4 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^4$
	pJDB207/IF2(1' _b) Δ	22	$1 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^4$
	pJDB207R/IF(α -1)	28	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$
	pJDB207R/IF(α -1) Δ	28	$4 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^5$
25	pJDB207Y/IF(α -1)	28	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$
	pJDB207Y/IF(α -1) Δ	28	$4 \cdot 10^4$	$8 \cdot 10^5$

Tabel 6

Sammenligning af interferonaktivitet i *Saccharomyces cerevisiae* stammer AH220 og GRF18 efter transformering med følgende rekombinantplasmider:

5	Plasmider	Interferonaktivitet (enh./1 gærcellekultur)	
		AH220	GRF18
	pJDB207/IF(8 ₁)	2×10^8	2×10^8
	pJDB207R/IF(α -3)	2×10^9	2×10^9
10	pJDB207/IF2(5 ₁)	1×10^7	9×10^6
	pJDB207R/IF(α -2)	2×10^8	2×10^8
	pJDB207R/IF(α -2) Δ 82	2×10^8	2×10^8

Eksempel 32.

Fremstilling af interferon- α -2 ved hjælp af en rekombinantstamme af gæren *Saccharomyces cerevisiae* i 300 liter skala

- 15 *Saccharomyces cerevisiae* stamme GRF18/pJDB207R/IF(α -2) Δ 82 bærer et plasmid, som indeholder en leucinmarkør, der tillader selektiv opretholdelse af plasmidet i værtsorganismen, et struktorgen for humant interferon- α -2 og sur phosphatase PHO5 promotoren, som tillader kopiering af IFN- α -2-genet i
- 20 medier indeholdende begrænsende mængder uorganisk phosphat.

Stammen holdes på agarskrårør fremstillet ud fra et defineret medium, som mangler aminosyren leucin, for at sikre tilbageholdelse af plasmidet. Frisk inokulerede skrårør inkuberes i 24 timer ved 30°C. Overfladekulturen af ét skrårør

25 resuspenderes i 3 ml fordykningsmedium, som derefter overføres til en første rystekolbeforkultur. 500 ml-kolben har en enkelt preplade og indeholder 100 ml fordyrket medium med følgende sammensætning (værdier i g/l): Gærekstrakt (Difco) 10,0, L-asparagin 6,6, KH₂PO₄ 1,0, MgSO₄·7H₂O 1,0, L-histidin 0,02 og D-glucose (monohydrat) 33,0.

30

Mediet, som er fremstillet under anvendelse af deioniseret vand, har en pH-værdi på ca. 6,0. Glucosen steriliseres særskilt. Denne første prækultur inkuberes i 24 timer ved 30°C på et orbitalrystebord med 5 cm's vandring ved en hastighed på 250 perioder pr. minut.

Den første forkulturkolbe indeholder mediet for de andre forkulturkolber. Disse kolber tilføres en inokulumængde på 1% rumfang/rumfang. Mediet og inkubationsbetingelserne er identiske med dem, der anvendes ved den første forkultur.

10 Dyrkningsvaskerne fra 36 sådanne kolber kombineres til tilvejebringelse af 1% rumfang/rumfang inokulum til hovedproduktionsfermenteringsapparatet.

Produktionsfermenteringsapparatet har et samlet rumfang på ca. 500 liter, indeholder 4 prelplader og en enkelt 6-bladet pladeturbineomrører med en diameter på 230 mm. Omrøringshastigheden er 450 omdr./min., overtrykket er 0,3 bar og beluftningshastigheden er 1 vol/vol/min.

Fermenteringsbeholderen indeholder 300 liter medium, som har følgende sammensætning (værdier angives i g/l): L-asparagin 2,0, L-histidin 0,02, KH_2PO_4 0,03, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5, NaCl 0,1, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1, KCl 1,0, D-glucose (monohydrat) 20,0, vitaminopløsning, 5 ml/l og sporelementopløsning 5 ml/l.

Mediet indstilles på pH-værdien 7,2 under anvendelse af NaOH inden sterilisering. Glucosen, vitaminerne og sporstofferne steriliseres separat og sættes til mediet. Stamopløsnin-

25 gerne for vitaminer og sporelementer har følgende sammensætninger (i g/l): Vitaminer - biotin 0,0002, calcium-D-pantothenat 0,04, folinsyre 0,0002, nicotinsyre 0,04, p-aminobenzoesyre 0,02, pyridoxin-hydrochlorid 0,04, riboflavin 0,02,

30 thiamin-hydrochlorid 0,04 og inositol 0,2 i 1 liter deioniseret vand, sporstoffer - borsyre 0,05, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,004, KI 0,01, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,02, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,04, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,02 og $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,04 i 1 liter deioniseret vand. Fermenteringstemperaturen er 30°C. pH-Værdien falder til en værdi på ca.

4,0-4,2, men kan om ønsket reguleres til en mellemliggende værdi under anvendelse af natriumhydroxid. Efter dyrkning i ca. 18 timer nås det maksimale udbytte af interferon [bestemt ifølge Armstrong (32)] Den optiske tæthed, som udgør ca. 2,0 enheder, og sur phosphatase aktiviteten er nyttige indikationer for fermenteringens fremskridt. Dyrkningsvæsken kan om nødvendigt afkøles til 10°C inden indhøstningen af gærcellerne.

Eksempel 33.

10 Isolering og rensning af HLyIFN- α -2

a) Fremstilling af polypeptidopløsningen til den monoklonale antistofsøjle

Et samlet rumfang på 600 liter dyrkningsvæske med en pH-værdi på 4,1 afkøles til 10°C. Cellerne isoleres ved hjælp af en slamfjernelsescentrifuge (Alfa-Laval BRPX-207). Den klare supernatant indeholder ingen IFN-aktivitet. Resterende supernatantvæske indeholdt i cellerne fortrænges ved vaskning med 20 lyseringspuffer A [100 mM KH_2PO_4 , 500 mM NaCl, 0,1% rumfang/rumfang Triton-X-100® og 0,1 mM PMSF indstillet med KOH til pH 7,5]. Indholdet af centrifugeskålen (7-liter) udtømmes under fuldstændig fjernelse, og slamfjernelsescentrifugen vaskes én gang med 5 liter lyseringspuffer A. Den fremkomne cellemasse fortyndes med puffer A til 60 liter og har en pH-værdi på 7,3. Suspensionen afkøles til 5-10°C og ledes gennem en DYNO®-mølle (type KD5) med en tilførselshastighed på 100 l/time. Møllen er forsynet med polyurethan-omrøringsplader og 4200 ml glasperler med en diameter på 0,5-0,75 mm diameter, og den drives med en omrøringshastighed på 1625 omdr./min. Suspensionen af de oplukkede celler (pH ca. 7,3) centrifugeres som beskrevet ovenfor. Supernatanten (75 liter) koncentrerer til 3 liter ved ultrafiltrering. 300 ml af denne polypeptidopløsning ledes gennem en H1P100 hulfilterpatron ved hjælp af et Amicon DC-2 hulfibersystem. Til filteret sæt-

tes yderligere 2 liter puffersystem B [30 mM Tris.HCl, 500 mM NaCl, indstillet på pH 8,5]. De sammenblandede filtrater og vaskevasker (2 liter) koncentrerer til 100 ml ved hjælp af en H1P10 hulfilterpatron. Koncentratet adsorberes på en søjle af DEAE-Trisacryl® M DEAE (LKB Ltd.). Søjlen vaskes, hvorefter den elueres med puffer C (200 mM NaCl, 25 mM Tris.HCl ved pH 8,5). Eluatet har en interferonaktivitet på $1,4 \times 10^6$ IE/mg polypeptid ved analyse ifølge Armstrong (32). Eluatet opbevares ved -20°C inden yderligere rensning på den monoklonale antistofsøjle.

b) Rensning af humant LyIFN- α -2 på en monoklonal antistofsøjle

Den monoklonale antistofsøjle NK2 (fra firma CELLTECH U.K.) (lejerumfang 20 ml) ækvilibreres med 20 mM Na-phosphat, 154 mM NaCl, pH 7,4, og portioner af den ovenfor fremstillede polypeptidopløsning sættes til søjlen ved stuetemperatur med en strømningshastighed på 50 ml/time. De første fraktioner indeholdende de ikke-adsorberede polypeptider og 100 ml PBS vaskevæske kasseres. Andre uspecifikke bundne polypeptider elueres med 110 ml PBS indeholdende yderligere 0,5 NaCl og 0,2% Triton X 100®. Søjlen vaskes med 200 ml 20 mM Na-phosphat, 0,3 M NaCl, pH 7,4, hvorefter de specifikt adsorberede polypeptider elueres med 50 ml puffer D (0,1 M citronsyre, 0,3 M NaCl, pH 2). Denne opløsning indstilles på pH 6,3 med 2 N natriumhydroxidopløsning og koncentrerer ved 4°C ved hjælp af en nedsænkkelig CXTM molekyelseparator (Millipore®). Koncentratet sættes til en søjle med Sephadex G-25® (fine) (2,6 x 34 cm, lejerumfang 200 ml) ækvilibreret med 0,025 M histidin.HCl ved pH 6,3. Søjlen elueres med den samme histidin.HCl-buffer ved 4°C og en strømningshastighed på 42 ml/time. 20 Fraktioner på 10,5 ml udtages. Polypeptidholdige fraktioner påvises ved hjælp af deres optiske absorption ved 280 nm. Fraktioner 7 og 8 indeholder polypeptidet med IFN-aktivitet, som lokaliseret ved analyse ifølge Armstrong (32). De aktive fraktioner indeholdende LyIFN- α -2 opbevares ved -20°C indtil yderligere anvendelse. IFN-aktiviteten i fraktionerne er $1,8 \times 10^8$ IE/mg polypeptid (32).

ved lyofilisering af de ovenfor fremstillede fraktioner fra 1 ml opløsninger fås 20-40 µg polypeptid.

SDS-polyacrylamidgelelektroforese (jf. (53)) giver en molekylvægt for det fremstillede LyIFN-α-2 på ca. 18 kDalton.

5

Eksempel 34.

Interferonudskillelse fra transformerede gærceller til dyrkningsmediet

For at fastlægge virkningen af en N-terminal proteinsignalsekvens på proteinsekretion dyrkes gærstamme *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207/IF(8₁) (indeholdende en hybridsegnalsekvens, jf. eksempel 17) og gærstamme *Saccharomyces cerevisiae* GRF18/pJDB207R/IF(α-3) (uden signalsekvens) som beskrevet i eksempel 28. Mængden af det producerede interferon i dyrkningsmediet samt mængden af interferon i celleekstrakterne (fremstillet som beskrevet i eksempel 31) bestemmes, og resultaterne er anført i tabel 7.

Tabel 7.

Sammenligning af interferonudskillelse fra transformeret *Saccharomyces cerevisiae* GRF18 stammer til dyrkningsmediet:

20

Saccharomyces cerevisiae stamme	Interferonaktivitet (enh./l gær-cellekultur)	
	celleekstrakt	dyrkningsmedium
GRF18/pJDB207R/IF(α-3)	$1,5 \times 10^9$	$<3 \times 10^4$
GRF18/pJDB207/IF(8 ₁)	2×10^8	2×10^7

Referencer

1. A.Hinnen et al., "Transformation of yeast", Proc.Natl. Acad.Sci. USA 75, 1929 (1978)
2. J.D.Beggs, "Transformation of yeast by a replicating
5 hybrid plasmid", Nature 275, 104 (1978)
3. J.Hicks et al., "Properties of yeast transformation", Cold Spring Harbor, Symp.Quant.Biol. 43, 1305 (1979)
4. K.Struhl et al., "High-frequency transformation of yeast, autonomous replication of hybrid DNA molecules",
10 Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 1035 (1979)
5. R.A.Hitzeman et al., "Expression of a human gene for interferon in yeast", Nature 293, 717 (1981)
6. J.D.Beggs et al., "Abnormal expression of chromosomal rabbit β -globin gene in *Saccharomyces cerevisiae*",
15 Nature 283, 835 (1980)
7. R.Axel, "The use of eukaryotic promoter sequences in the production of proteinaceous materials", PCT patent-ansøgning 81/02425
8. J.A.Carbon et al., "DNA capable of replication and stable
20 mitotic maintenance in a host eukaryote, method of preparation thereof and eukaryotic cell containing same", europæisk patentansøgning 48081 (The regents of the University of California)
9. D.T.Stinchcomb et al., "Eukaryotic autonomously replicating segment", europæisk patentansøgning 45573 (The board of trustees of Leland Stanford Junior University)
- 25 10. "Plasmidvektoren, Hybridplasmide und ihre Verwendung zur Herstellung von Proteinen", DE offentliggørelsesskrift nr. 2.923.297 (Institut Pasteur)
- 30 11. "Procédé de production de protéines par expression des gènes correspondants dans des microorganismes et vecteurs susceptibles d'être mis en oeuvre dans de tels procédés", FR patentansøgning 2.458.585 (Institut Pasteur)
- 35 12. M.Aigle et al., "Nouveaux plasmides hybrides et microorganismes les contenant", europæisk patentansøgning nr. 11562 (Agence nationale de valorisation de la recherche)

13. A.Schurr et al., J.Gen.Microbiol. 65, 291 (1971) og
A.Toh-e et al., Mol.Gen.Genet. 162, 139 (1978)
14. P.Mildner et al., Biochim.Biophys.Acta 429, 274 (1976)
15. A.M.Maxam et al. i "Methods in Enzymology", bd. 65,
5 side 499, New York 1980
16. A.Hinnen et al., "Vectors for cloning in yeast", Curr.
Top.Microbiol.Immunol. 96, 101 (1982)
17. A.Hinnen et al. i "Eukaryotic Gene Regulation", bd. 14,
side 43, New York 1979
- 10 18. "Genetic Engineering" (udg. A.M.Chakrabarty), West Palm
Beach 1978
19. J.Lodder, "The Yeasts", Amsterdam 1971
20. M.Grunstein et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72, 3961 (1979)
21. A.Jimenez et al., Nature 287, 869 (1980)
- 15 22. T.Staehelin et al., J.Biol.Chem. 256, 9750 (1981)
23. M.V.Olson et al., J.Mol.Biol. 132, 387 (1979)
24. H.Meyer, FEBS Lett. 90, 341 (1978)
25. B.Hohn et al. i "Genetic Engineering", bd. 2, side 169,
New York 1980
- 20 26. B.Hohn i "Methods in Enzymology", bd. 68, side 299,
New York 1979
27. N.Mantei et al., Gene 10, 1 (1980)
28. J.D.Beggs i "Genetic Engineering", bd. 2, side 175,
New York 1981
- 25 29. M.Mandel et al., J.Mol.Biol. 53, 159 (1970)
30. J.H.Miller, "Experiments in Molecular Genetics", Cold
Spring Harbor 1972
31. A.Toh-e et al., J.Bacteriol. 113, 727 (1973)
32. J.A.Armstrong, Appl.Microbiol. 21, 723 (1971)
- 30 33. J.B.Gurdon, J.Embryol.Exp.Morph. 20, 401-414 (1968)
34. Barth, J.Embryol.Exp.Morph. 7, 210-222 (1959)
35. A.Colman, Cell 17, 517 (1979)
36. A.Efstratiadis et al., Cell 4, 367-378 (1975)
37. T.Maniatis et al., Cell 8, 163-182 (1976)
- 35 38. J.H.J.Hoeijmakers et al., Gene 8, 391-417 (1980)
39. A.C.Peacock et al., Biochemistry 6, 1818 (1967)
40. K.Itakura et al., J.Am.Chem.Soc. 97, 7327 (1975)

41. J.F.M.de Rooij et al., Recl.Trav.Chim. Pays-Bas 98, 537-548 (1979)
42. W.Mueller et al., J.Mol.Biol. 124, 343 (1978)
43. D.V.Goeddel et al., Nature 290, 20 (1981)
- 5 44. C.Weissmann, europæisk patentansøgning nr. 32134 (Biogen N.V.)
45. T.Taniguchi et al., Gene 10, 11 (1980)
46. M.Streuli et al., Science 209, 1343 (1980)
47. Perlman et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79, 781 (1982)
- 10 48. A.J.Berk et al., Cell 12, 721-732 (1977)
49. J.Messing, i det 3. Cleveland/Symposium om macromolekyler: Recombinant DNA (udg. A.Walton), Elsevier, Amsterdam 1981, pp. 143-153
50. D.S.Holmes et al., Anal.Biochem. 114, 193-197 (1981)
- 15 51. N.M.Gough et al., J.Mol.Biol. 162, 43-67 (1982)
52. Pasek et al., Nature 282, 575-579 (1979)
53. U.K.Laemmli, Nature 227, 680-685 (1970).

P a t e n t k r a v:

1. DNA restriktionsfragment, k e n d e t e g n e t ved, at det hovedsagelig består af den undertrykkende Saccharomyces cerevisiae sur phosphatase (PHO5) promotor omfattende
- 5 sekvensen

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT
 ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA
 10 GGTAAAAGGTTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA
 CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGATT
 AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG
 CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT
 15 CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT
 GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG
 CTTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACCA
 ATGTTTAAATCTGTTGTTTATTCAATTTAGCCGCTTCTTTGGCCAATGCAGGTACCATT
 20 CCCTTAGGCAAACCTAGCCGATG

eller underfragmenter deraf, som beholder promotorfunktionen.

2. DNA fragment ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det har sekvensen

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT
 ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA
 GGTAAAAGGTTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA
 30 CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGATT
 AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG
 CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT
 CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT
 GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG
 35 CTTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACCA
 ATGTTTAAATCTGTTGTTTATTCAATTTAGCCGCTTCTTTGGCCAATGCAGGTACCATT
 CCCTTAGGCAAACCTAGCCGATG

og underfragmenter deraf, som bibeholder promotorfunktionen.

3. DNA fragment ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det har sekvensen

5
G
ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT
ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA
GGTAAAAGGTTTCATAGCGCTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA
10 CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGAGTT
AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG
CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT
CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT
GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTACTATGG
15 CTTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGGG

4. DNA fragment ifølge krav 1, kendetegnet ved, at det har sekvensen

20
G
ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT
ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA
25 GGTAAAAGGTTTCATAGCGCTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA
CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAGAGAGTT
AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG
CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT
CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT
30 GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG
CTTCATCTCTCATGAGAATAAGACAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTAGG

5. Fremgangsmåde til fremstilling af et DNA-fragment ifølge krav 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at man
35 (A) fremstiller det sure phosphatase PHO5-gen ved komplementering af *Saccharomyces cerevisiae*-stammer, som mangler sur

- phosphatase PHO5, ved transformering med plasmid DNA fra et *Saccharomyces cerevisiae*-bibliotek indeholdende vildtypekopien af genet og isolerer genet,
- (B) fremstiller subkloner af det dannede gen og
- 5 (C) identificerer beliggenheden af promotorområdet for ovennævnte underkloner og isolerer DNA fragmenter indeholdende sur phosphatase PHO5-promotoren ved restriktionsnedbrydning og til fremstilling af underfragmenter afkorter de dannede DNA restriktionsfragmenter ved nedbrydning med en restriktionsendonuklease eller med en passende exonuklease.
- 10
6. Gærhybridvektor, kendet *e g n e t* ved, at den indeholder en *Saccharomyces cerevisiae* sur phosphatase promotorsekvens ifølge krav 1-4 og et gær- eller ikke-gærpolypeptidkodningsområde, som er kontrolleret af promotoren,
- 15 med den begrænsning, at det nævnte gærpolypeptidkodningsområde ikke er PHO5-genet.
7. Gærhybridvektor ifølge krav 6, kendet *e g n e t* ved, at gær- eller ikke-gærpolypeptidkodningsområdet koder for et humant interferon.
- 20
8. Gærhybridvektor ifølge krav 7, kendet *e g n e t* ved, at gær- eller ikke-gærpolypeptidkodningsområdet koder
- 25 for et humant lymfoblastoid-interferon.
9. Gærhybridvektor ifølge krav 6-8, kendet *e g n e t* ved, at den indeholder yderligere DNA sekvenser afledt af gruppen bestående af et bakterieplasmid, bakteriofag λ , gær 2 μ plasmid og/eller gær kromosomal DNA.
- 30
10. Gærhybridvektor ifølge krav 9, kendet *e g n e t* ved, at den indeholder gær kromosomal DNA omfattende et autonomt kopieringssegment og et markørgen.
- 35
11. Gærhybridvektor ifølge krav 6, kendet *e g n e t*

ved, at den omfatter transskriptionstermineringssignaler for et gærgen.

12. Gærhybridvektor ifølge krav 11, k e n d e t e g -
5 n e t ved, at den indeholder transskriptionstermineringssignaler for PHO5 genet.

13. Gærhybridvektor ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t
ved, at der inden gær- eller ikke-gærpolypeptidkodningsområdet
10 findes en signalsekvens.

14. Gærhybridvektor ifølge krav 6, k e n d e t e g n e t
ved, at gær- eller ikke-gærpolypeptidkodningsområdet er
forbundet med sur phosphatase PHO5 promotoren mellem den
15 major sur phosphatase PHO5 mRNA start og ATG for sur phosphatase PHO5 kodningsområdet.

15. Gærhybridvektor ifølge krav 14, k e n d e t e g -
n e t ved, at de yderligere DNA sekvenser omfatter et kopie-
20 ringsudgangspunkt for Escherichia coli og en selektiv genetisk markør for Escherichia coli.

16. Gærhybridvektor ifølge krav 14, k e n d e t e g n e t
ved, at de yderligere DNA sekvenser omfatter et gær kopie-
25 ringsudgangspunkt og en selektiv genetisk markør for gær.

17. Gærhybridvektor ifølge krav 15, k e n d e t e g -
n e t ved, at den yderligere omfatter et gær kopieringsud-
gangspunkt og en selektiv genetisk markør for gær.

30

18. Fremgangsmåde til fremstilling af en gærhybridvektor
ifølge krav 6-17, k e n d e t e g n e t ved, at man i en
vektor DNA indfører et DNA fragment, der hovedsagelig består
af Saccharomyces cerevisiae sur phosphatase (PHO5) promotor
35 ifølge krav 1-4 og et gær- eller ikke-gærpolypeptidkodnings-
område, som er kontrolleret af promotoren.

19. *Saccharomyces cerevisiae*, k e n d e t e g n e t ved, at den er transformeret med en gærhybridvektor ifølge krav 6-17.
- 5 20. Fremgangsmåde til fremstilling af en transformeret *Saccharomyces cerevisiae* ifølge krav 19, k e n d e t e g n e t ved, at man transformerer *Saccharomyces cerevisiae* med en gærhybridvektor ifølge krav 6-15.
- 10 21. Fremgangsmåde til fremstilling af et gær- eller ikke-gærpolypeptid, k e n d e t e g n e t ved, at man (1) dyrker transformeret *Saccharomyces cerevisiae* ifølge krav 19 og (2) isolerer og renser polypeptidet.
- 15 22. Fremgangsmåde ifølge krav 21 til fremstilling af et gær- eller ikke-gærpolypeptid, k e n d e t e g n e t ved, at den transformerede *Saccharomyces cerevisiae* dyrkes i et dyrkningsmedium indeholdende assimilerbare carbonkilder og nitrogenkilder og uorganiske salte.
- 20 23. Fremgangsmåde ifølge krav 21 til fremstilling af et gær- eller ikke-gærpolypeptid, k e n d e t e g n e t ved at dyrkningsmediet indeholder uorganisk phosphat i lav koncentration.
- 25 24. Fremgangsmåde ifølge krav 21, k e n d e t e g n e t ved, at polypeptidet er et humant interferon.
- 30 25. Fremgangsmåde ifølge krav 21, k e n d e t e g n e t ved, at det humane interferon er et humant lymphoblastoidt interferon.
- 35 26. Fremgangsmåde ifølge krav 21, k e n d e t e g n e t ved, at det humane lymphoblastoide interferon er IFN- α -1.
27. Fremgangsmåde ifølge krav 21, k e n d e t e g n e t

ved, at det humane lymphoblastoide interferon er IFN- α -2.

28. Fremgangsmåde ifølge krav 21, k e n d e t e g n e t
ved, at det humane lymphoblastoide interferon er IFN- α -3.

Fig. 1

UDGANGSPLOSMIDER TIL DNA SEKVENSERING OG KOPIERINGSPLASMID-DANNELSE

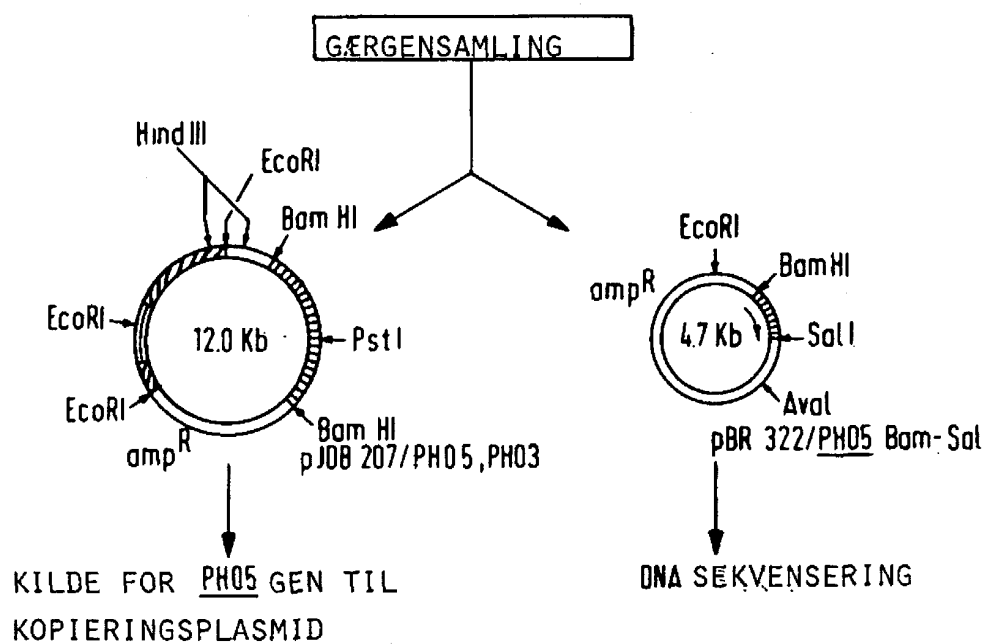
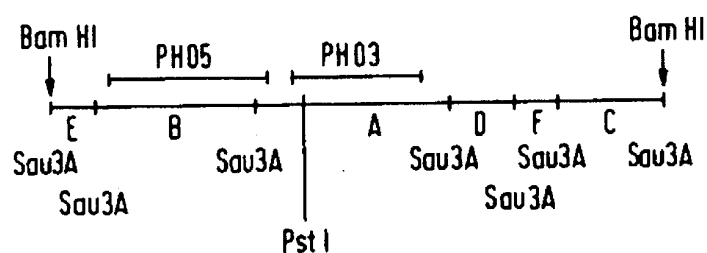


Fig. 2

LOKALISERING AF DET UNDERTRYKKELIGE (PH05) OG DET
STRUKTURELLE (PH03) SUR PHOSPHATASE GEN

PHOSPHATASE AKTIVITETKLONED E UNDERFRAGMENTER

SLUKKET IKKE-SLUKKET

(+P _i)	(-P _i)	E	B	A	D	F	C
1. +	++	+	+	+	+	+	+
2. +	++	+	+	+	+	+	+
3. +	++	+	+	+	+	+	+
4. +	++	+	+	+	+	+	+
5. +	+	+	+	+	+	+	+
6. +	+	+	+	+	+	+	+
7. -	-	+	+	+	+	+	+
8. -	-	+	+	+	+	+	+
9. -	-	+	+	+	+	+	+
10. -	++	+	+	+	+	+	+
11. -	-	+	+	+	+	+	+

Pst I

Fig. 3

NUKLEOTIDSEKVENNS FOR BamHI-SalI RESTRIKTIONSFRAGMENTET
I PHO5 INDEHOLDENDE PHO5 PROMOTOROMRÅDET

6

-540

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT

-480

ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA

-420

GGTAAAAGGTTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA

-360

CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAAAGAGTT

-300

AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG

-240

CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTGGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT

-180

CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT

-120

GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG

-60

CTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTACCA

+1

ATG TTT AAA TCT GTT GTT TAT TCA ATT TTA GCC GCT TCT TTG GCC +45
MET PHE LYS SER VAL VAL TYR SER ILE LEU ALA ALA SER LEU ALA

AAT GCA GGT ACC ATT CCC TTA GGC AAA CTA GCC GAT G⁺⁸²
ASN ALA GLY THR ILE PRO LEU GLY LYS LEU ALA ASP

Fig. 4

DANNELSESSKEMA FOR HYBRIDPLASMIDERNE p30IFN2(8') OG p30IFN2'(8')

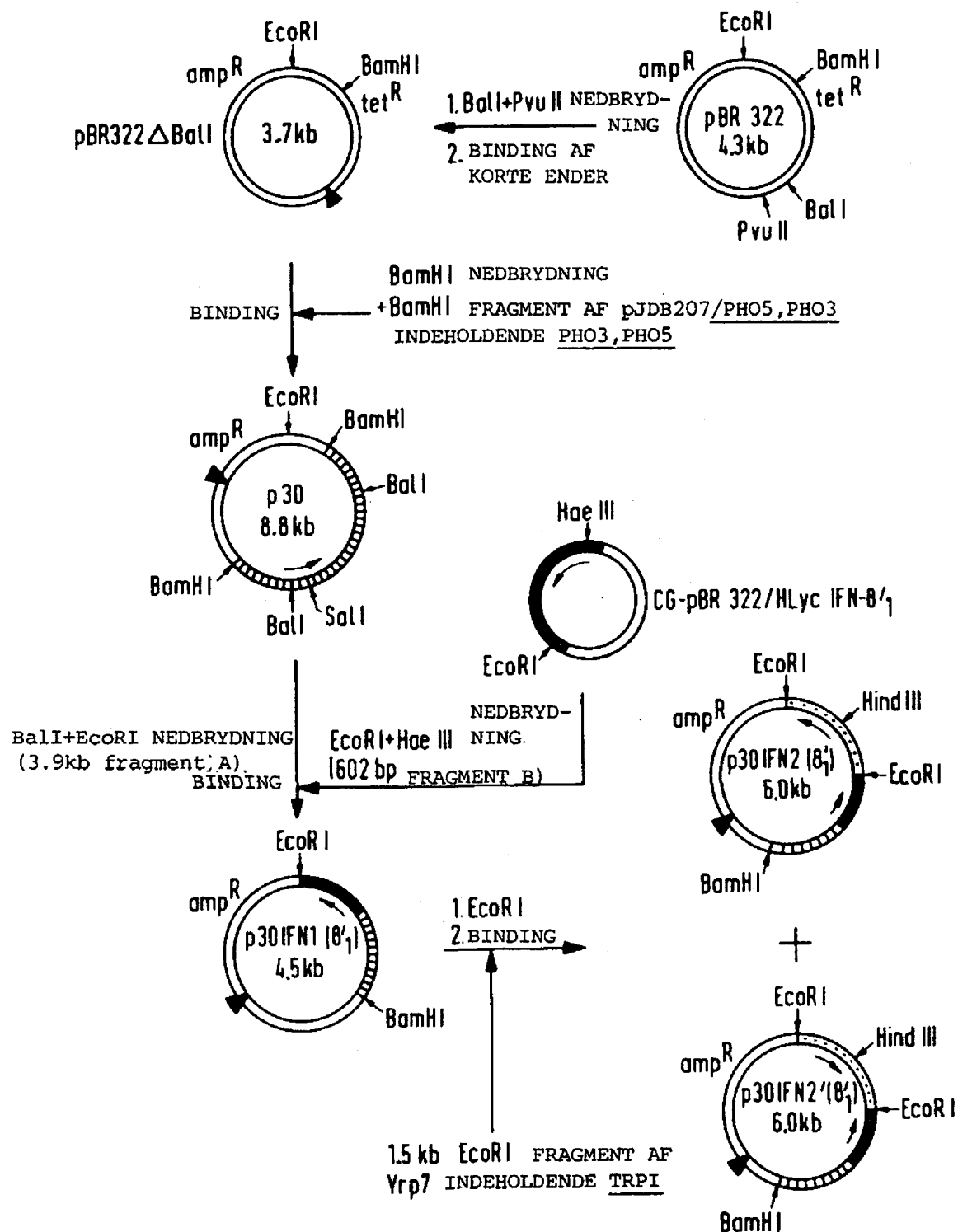


Fig. 5

BINDING AF PHO5 PROMOTOR DNA MED INDSAT cDNA I CG-pBR322/HLycIFN-3'

- a. DNA SEGMENT INDEHOLDENDE PHO5 PROMOTOR OG NABOPROTEIN-KODNINGSOMRÅDE

ROBINSON-CAMARÉ

BamHI

↓

.....PHO5 promoter-----+1

ATG TTT AAA TCT GTT GTT

+43

TAT TCA ATT TTA GCC GCT TCT TTG GCC AAT GCA GGT ACC

↑

Bal I (Hae III)

- b. DNA SEGMENT INDEHOLDENDE INTERFERON PROMOTOR OG NABO-
PROTEINKODNINGSOMRÅDE I CG-pBR322/HLycIFN-8;

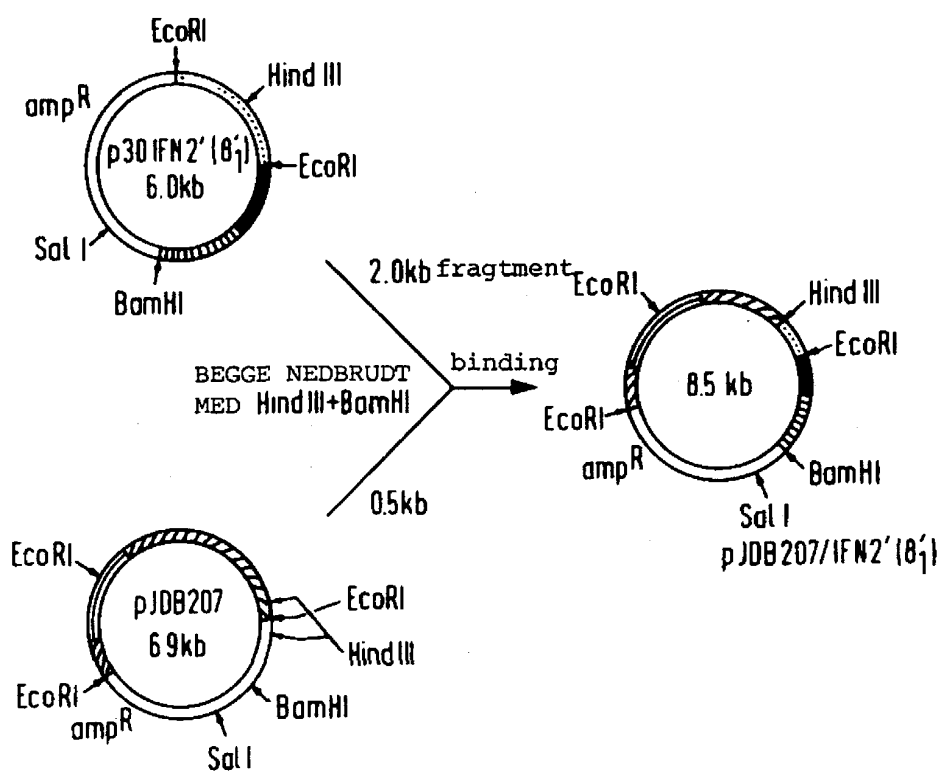
..... INTERFERON PROMO-----+1 Hae III
TER ATG GCC TCG CCC TTT GCT
+28
TTA CTG ATG GCC CTG GTG GTG CTC AGC TGC AAG TCA AGC
Hae III EcoRI

- c. DNA SEGMENT I FUSIONSPRODUKTET AF a. OG b. I p30IFN1(8;)
OG N-TERMINAL SEKVENS I DET DANNED E INTERFERON POLYPEPTID

BamHI
 ↓ PHO5 PROMOTOR +1
 ATG TTT AAA TCT GTT GTT
 Met Phe Lys Ser Val Val

TAT TCA ATT TTA GCC GCT TCT TTG GCC CTG GTG GTG CTC
 Tyr Ser Ile Leu Ala Ala Ser Leu Ala Leu Val Val Leu

Hae III
 ↓
 EcoRI
 ↓

Fig. 6DANNELSE AF PLASMID pJDB207/IFN2' (8₁)

NAMALWA ds cDNA SYNTSE OG KONSTRUKTION AF REKOMBINANT DNA 174905 B1 MOLEKYLER

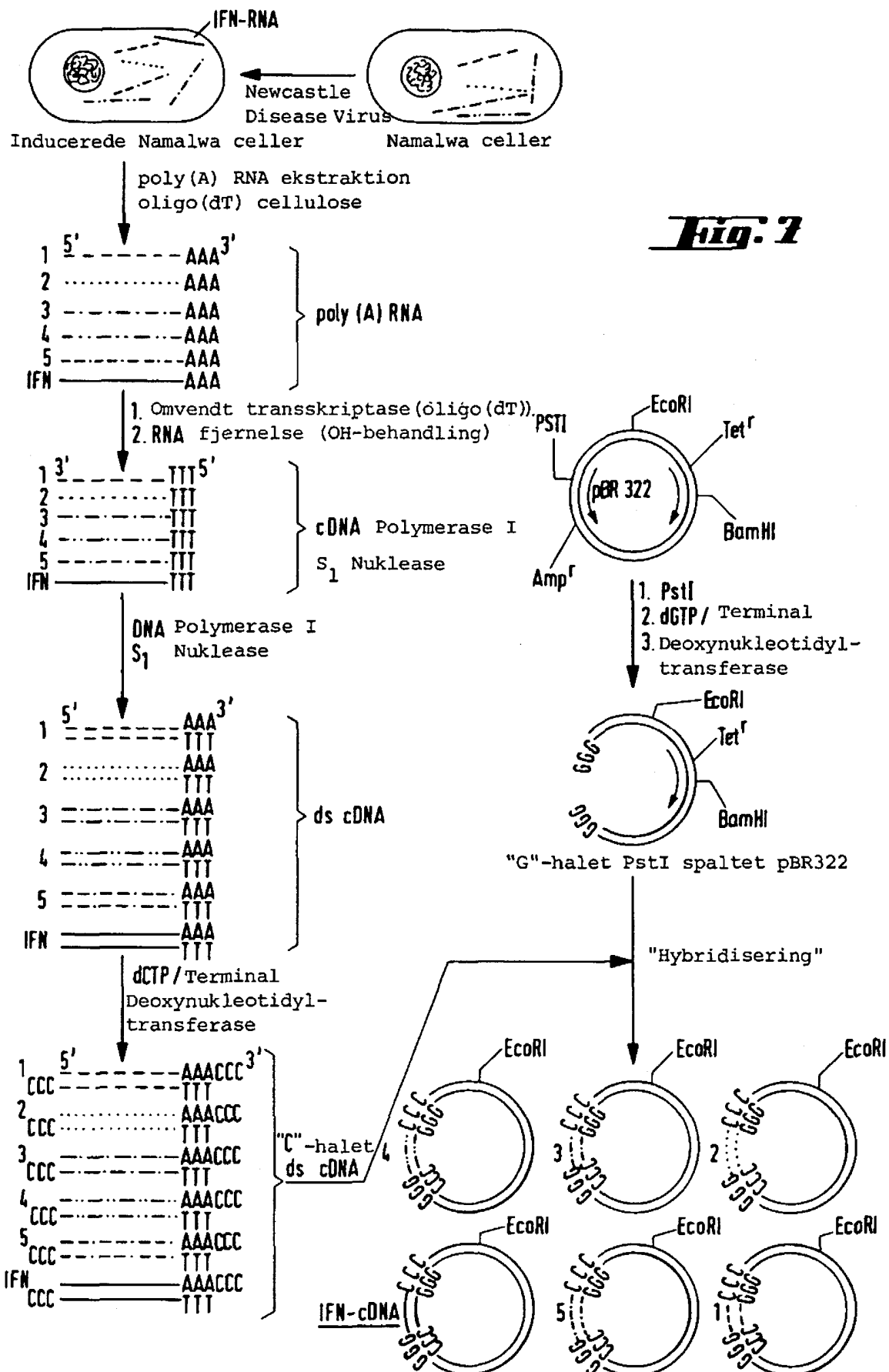
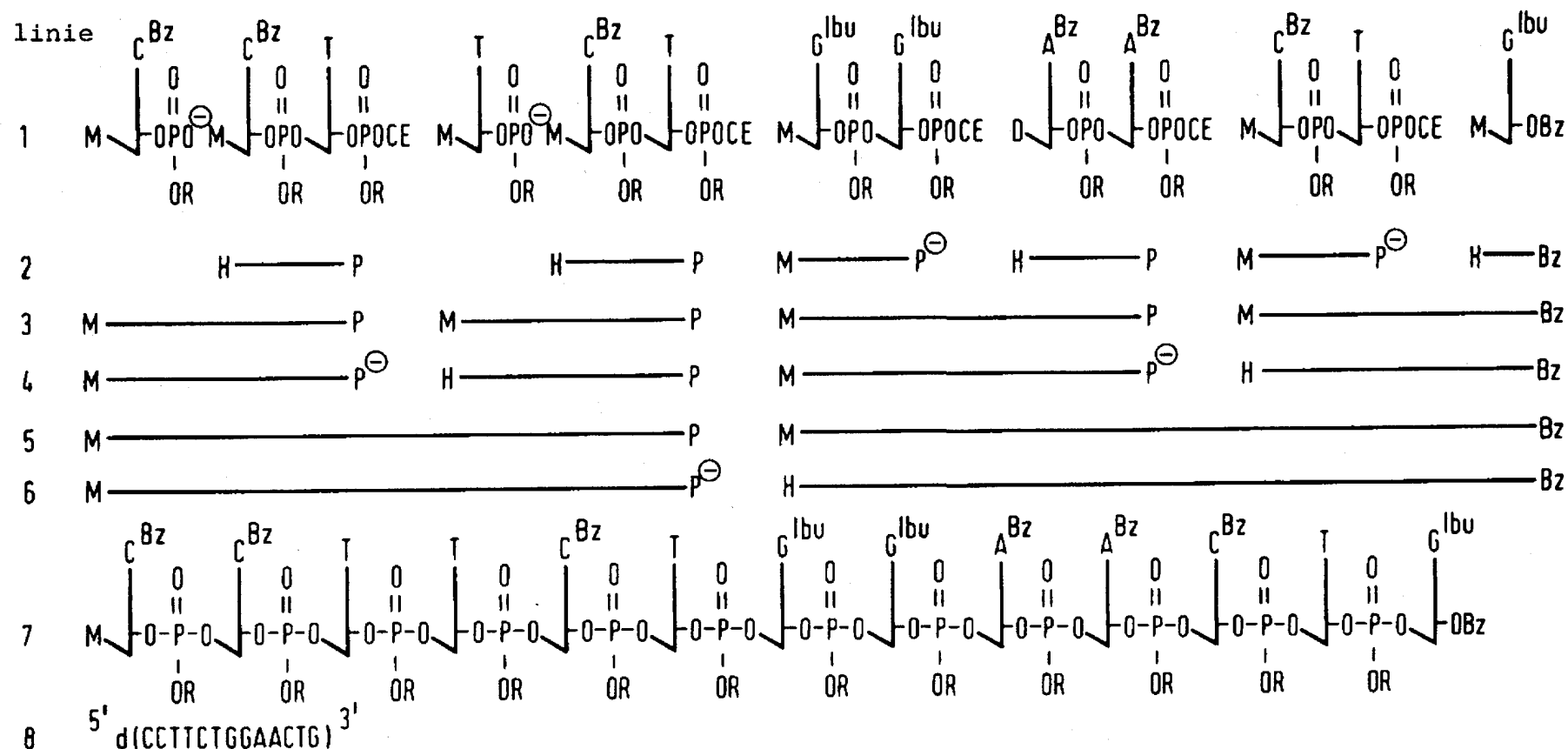


Fig. 8

FREMSTILLING AF DNA PRIMER (13MER), SOM SUPPLERER α_1 OG β IEN mRNA



FORKORTELSER

M = monomethoxytrityl

Ce = 2-cyanoethyl

lbu = isobutyl

P = phosphotriester

H = 5'-OH

R = 2-chlorophenyl

Bz = benzoyl

D = dimethoxytrityl

P[⊖] = phosphodiester

Fig. 9

FREMSTILLING AF HuIFN- β - OG HuIFN- α -SPECIFIK SPORINGSDEL OG ANVENDELSE DERAFTIL IDENTIFIKATION AF HUMANLYMPHOBLASTOIDE IFN-HOLDIGE KLONER

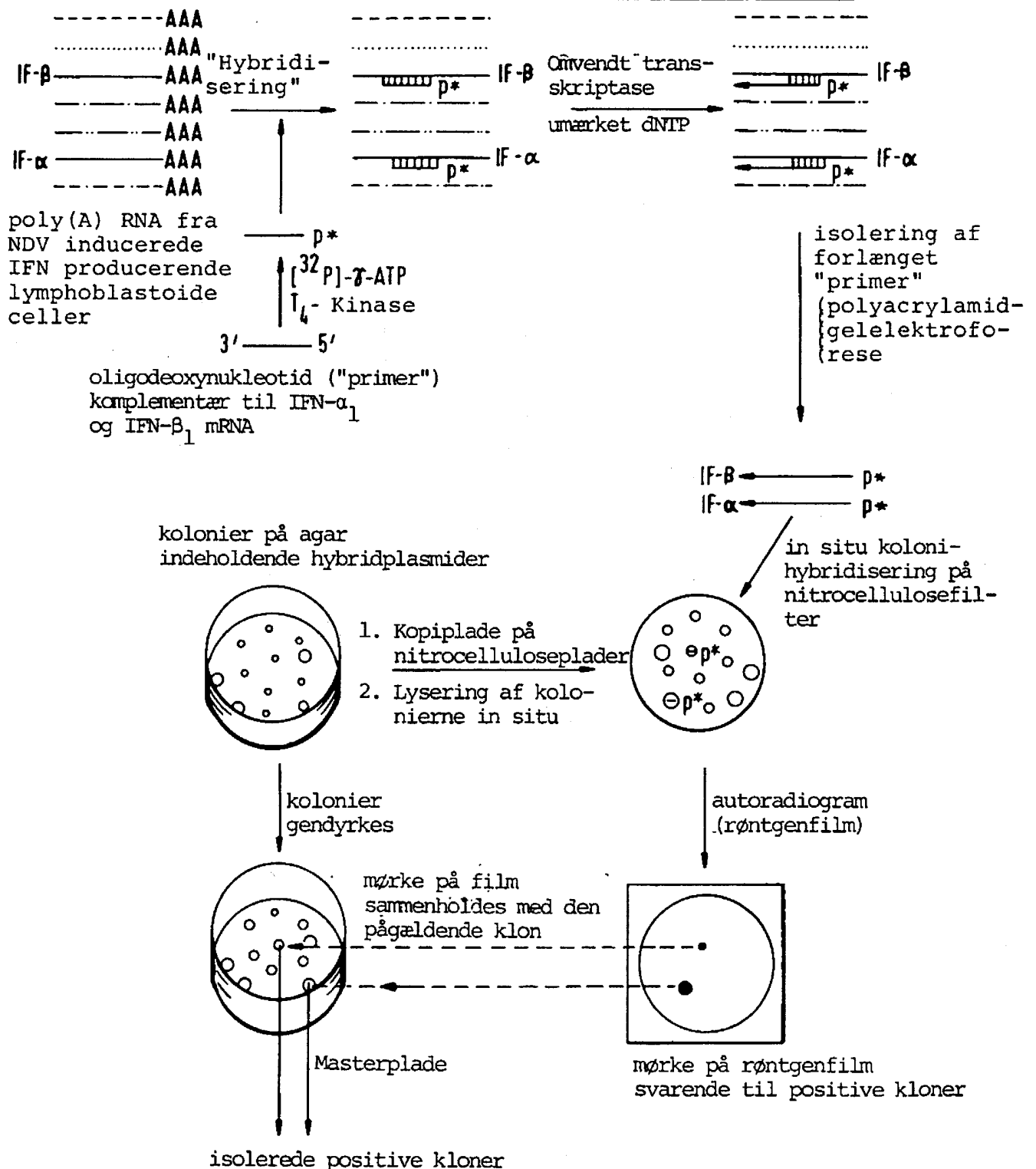


Fig. 10

NUKLEOTIDSEKvens I DET INDSATTE C-DNA I REKOMBINANTPLASMID DNA CG-PBR322/HLycIFN-1'b

1
 MET ALA LEU SER PHE SER LEU LEU MET ALA VAL LEU VAL LEU SER TYR LYS SER ILE CYS SER LEU GLY
 ACATCCA ATG GCC CTG TCC TTT TCT TTA CTG ATG GCC GTG CTG GTG CTC AGC TAC AAA TCC ATC TGT TCT CTG GGC 69
 CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN MET GLY ARG ILE SER
 TGT GAT CTG CCT CAG ACC CAC AGC CTG GGT AAT AGG AGG GCC TTG ATA CTC CTG GCA CAA ATG GGA AGA ATC CCC 144
 PRO PHE SER CYS LEU LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLY PHE PRO GLN GLU GLU PHE ASP GLY ASN GLN PHE GLN LYS
 CCT TTC TCC TGC CTG AAG GAC AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GAT GGC AAC CAG TTC CAG AAG 219
 ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR LYS ASP SER SER ALA
 GCT CAA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ACC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT 294
 THR TRP GLU GLN SER LEU LEU GLU LYS PHE SER THR GLU LEU ASN GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
 ACT TGG GAA CAG AGC CTC CTA GAA AAA TTT TCC ACT GAA CTT AAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGC GTG 369
 ILE GLN GLU VAL GLY VAL GLU GLU THR PRO LEU MET ASN VAL ASP SER ILE LEU ALA VAL LYS LYS TYR PHE GLN
 ATA CAG GAG GTT GGG GTG GAA GAG ACT CCC CTG ATG AAT GTG GAC TCC ATC CTG GCT GTG AAG AAA TAC TTC CAA 444
 ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG
 AGA ATC ACT CTT TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA 519
 SER PHE SER LEU SER LYS ILE PHE GLN GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU
 TCC TTC TCT TTA TCA AAA ATT TTT CAA GAA AGA TTA AGG AGG AAG GAA TGA AACCTGTTTCAACATGGAATGATCTGTATT 601
 GACTAATACACCACTCCACACTTCTATGACTTCTGCCATTTCAAAGACTCATTTCTCCTATAACCAACCGCATGAGTTGAATCAAATTTTCAGATCTTT 700
 TCAGGAGTGTAAGGAAACATCATGTTTACCTGTGCAGGCACTAGTCTTTACAGATGACCATGCTGATAGATCTAATTATCTATCTATTGAAATATTTA 799
 TTTATTTATTAGATTTAAATTATTTTGTCCATGTAATATTATGTGTACTTTTACATTGTGTTATATCAAATATGTTATTTATTTAGTCAATATAT 898
 TATTTTCTTTTATTAATTTTACTATTAATACTTCTTATATTATTTGTTTATG

Fig. 11

NUKLEOTIDSEKvens I DET INDSATTE C-DNA I REKOMBINANTPLASMID DNA CG-pBR322/HLYcIFN- β_1

SER SER ASN PHE GLN CYS GLN LYS LEU LEU TRP GLN LEU ASN
AGC AGC AAT TTT CAG TGT CAG AAG CTC CTG TGG CAA TTG AAT 138

GLY ARG LEU GLU TYR CYS LEU LYS ASP ARG MET ASN PHE ASP ILE PRO GLU GLU ILE LYS GLN LEU GLN GLN PHE
GGG AGG CTT GAA TAC TGC CTC AAG GAC AGG ATG AAC TTT GAC ATC CCT GAG GAG ATT AAG CAG CTG CAG CAG TTC 213

GLN LYS GLU ASP ALA ALA LEU THR ILE TYR GLU MET LEU GLN ASN ILE PHE ALA ILE PHE ARG GLN ASP SER SER
CAG AAG GAG GAC GCC GCA TTG ACC ATC TAT GAG ATG CTC CAG AAC ATC TTT GCT ATT TTC AGA CAA GAT TCA TCT 288

SER THR GLY TRP ASN GLU THR ILE VAL GLU ASN LEU LEU ALA ASN VAL TYR HIS GLN ILE ASN HIS LEU LYS THR
AGC ACT GGC TGG AAT GAG ACT ATT GTT GAG AAC CTC CTG GCT AAT GTC TAT CAT CAG ATA AAC CAT CTG AAG ACA 363

VAL LEU GLU GLU LYS LEU GLU LYS GLU ASP PHE THR ARG GLY LYS LEU MET SER SER LEU HIS LEU LYS ARG TYR
GTC CTG GAA GAA AAA CTG GAG AAA GAA GAT TTC ACC AGG GGA AAA CTC ATG AGC AGT CTG CAC CTG AAA AGA TAT 438

TYR GLY ARG ILE LEU HIS TYR LEU LYS ALA LYS GLU TYR SER HIS CYS ALA TRP THR ILE VAL ARG VAL GLU ILE
TAT GGG AGG ATT CTG CAT TAC CTG AAG GCC AAG GAG TAC AGT CAC TGT GCC TGG ACC ATA GTC AGA GTG GAA ATC 513

LEU ARG ASN PHE TYR PHE ILE ASN ARG LEU THR GLY TYR LEU ARG ASN
CTA AGG AAC TTT TAC TTC ATT AAC AGA CTT ACA GGT TAC CTC CGA AAC TGAAGATCTCCTAGCCTGTGCCTCTGGGACTGGAC 595

AATTGCTTCAAGCATTCTTCAACCAGCAGATGCTGTTTAAGTGACTGATGGCTAATGTACTGCATATGAAAGGACACTAGAAGATTTTGAATTTTAT 695

TAAATTATGAGTTATTTTTATTTATTTAAATTTATTTTGGAAAATAAATTATTTTGGTGCAAAAGTC

Fig. 12

NUKLEOTIDSEKvens I DET INDSATTE I REKOMBINANT PLASMID DNA CG-PBR322/HLYcIFN-4₁

SER SER ALA
TCA TCT GCT 294

ALA TRP ASP GLU THR LEU LEU ASP LYS PHE TYR THR GLU LEU TYR GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA GAC AAA TTC TAC ACT GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGT GTG 369

ILE GLN GLY VAL GLY VAL THR GLU THR PRO LEU MET LYS GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL ARG LYS TYR PHE GLN
ATA CAG GGG GTG GGG GTG ACA GAG ACT CCC CTG ATG AAG GAG GAC TCC ATT CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA 444

ARG ILE THR LEU TYR LEU LYS GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG
AGA ATC ACT CTC TAT CTG AAA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA 519

SER PHE SER LEU SER THR ASN LEU GLN GLU SER LEU ARG SER LYS GLU
TCT TTT TCT TTG TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGT TTA AGA AGT AAG GAA TGA AACTGGTTCAACATGGAAATGATTTTCATT 601

GATTCGTATGCCAGCTCACCTTTTATGATCTGCCATTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTATGACCATGACACGATTTAAATCTTTCAAATGTTTTAG 700

GAGTATTAATCAACATTGTATTTCAGCTCTTAAGGCACTAGTCCCTTACAGAGGACCATGCTGACTGATCCATTATCTATTTAAATATTTTAAATATT 799

ATTTATTTAACTATTTATAAAACAACCTATTTTGTTCATATTATGTCATGTGCACCTTGCACAGTGGTTAATGTAATAAAATGTGTTCTTTGTATTT 898

GGTATATTTATTTGTGTTGTTTCATTGAACTTTTGTATGGAACCTTTGTACTTGTGTTATTTCTTTAAATGAAATCCAAGCCTAATTGTGCAACCTGA 997

TTACAGAATAACTGGTACACTTCATTTATCCATCAATATTATATTCAAGATATAAGTAAAAATAAACTTTCTGTAAACCAAGTTG

Fig. 13

NUKLEOTIDSEKvens I DET INDSATTE C-DNA I REKOMBINANT PLASMID DNA CG-PBR322/HLYcIFN-8'1

1
 MET ALA SER PRO PHE ALA LEU LEU MET ALA LEU VAL VAL LEU SER CYS LYS SER SER CYS SER LEU GLY
 ATCTATG ATG GCC TCG CCC TTT GCT TTA CTG ATG GCC CTG GTG GTG CTC AGC TGC AAG TCA AGC TGC TCT CTG GGC₆₉
 Hae III Hae III
 CYS ASP LEU PRO GLU THR HIS SER LEU ASP ASN ARG ARG THR LEU MET LEU LEU ALA GLN MET SER ARG ILE SER
 TGT GAT CTC CCT GAG ACC CAC AGC CTG GAT AAC AGG AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA CAA ATG AGC AGA ATC TCT₁₄₄
 PRO SER SER CYS LEU MET ASP ARG HIS ASP PHE GLY PHE PRO GLN GLU GLU PHE ASP GLY ASN GLN PHE GLN LYS
 CCT TCC TCC TGT CTG ATG GAC AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GAT GGC AAC CAG TTC CAG AAG₂₁₉
 ALA PRO ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU LEU ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR LYS ASP SER SER ALA
 GCT CCA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG CTG ATC CAG CAG ATC TTC AAC CTC TTT ACC ACA AAA GAT TCA TCT GCT₂₉₄
 ALA TRP ASP GLU ASP LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
 GCT TGG GAT GAG GAC CTC CTA GAC AAA TTC TGC ACC GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC TTG GAA GCC TGT GTG₃₆₉
 MET GLN GLU GLU ARG VAL GLY GLU THR PRO LEU MET ASN ALA ASP SER ILE LEU ALA VAL LYS LYS TYR PHE ARG
 ATG CAG GAG GAG AGG GTG GGA GAA ACT CCC CTG ATG AAT GCG GAC TCC ATC TTG GCT GTG AAG AAA TAC TTC CGA₄₄₄
 ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG
 AGA ATC ACT CTC TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA₅₁₉
 SER LEU SER LEU SER THR ASN LEU GLN GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU
 TCC CTC TCT TTA TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGA TTA AGG AGG AAG GAA TAA CACCTGGTCCAACATGAAACAATTCTTATTG₆₀₁
 ACTCATATACCAGGTCACGCTTTTCATGAATTCTGCCATTTCAAAGACTCTCACTTCTGCTATAACTATGACCATGCTGATAAACTGATTTATCTATTTA₇₀₀
 EcoR I
 AATATTTATTTAGCTATTCATAAGATTTAAATTATTTTTGTTCAATAACATCATGTGCATCTTTACACTGTGGTTAGTGTAAATAAACATGTTCTTAA₇₉₉
 TATTTACTCAAATTCATTATTTTA

NUKELOTIDSEKVEN S I DET INDSATTE C-DNA I REKOMBINANT PLASMID DNA CG-PBR322/HLycIFN-5₁

Fig. 14.

1
MET ALA LEU THR PHE TYR LEU LEU VAL ALA LEU VAL VAL LEU SER TYR LYS SER PHE SER SER LEU GLY
ATCTACA ATG GCC TTG ACT TTT TAT TTA CTG GTG GCC CTA GTG GTG CTC AGC TAC AAG TCA TTC AGC TCT CTG GGC 69
CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN MET ARG ARG ILE SER
TGT GAT CTG CCT CAG ACT CAC AGC CTG GGT AAC AGG AGG GCC TTG ATA CTC CTG GCA CAA ATG CGA AGA ATC TCT 144
PRO PHE SER CYS LEU LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
CCT TTC TCC TGC CTG AAG GAC AGA CAT GAC TTT GAA TTC CCC CAG GAG GAG TTT GAT GAT AAA CAG TTC CAG AAG 219
ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR LYS ASP SER SER ALA
GCT CAA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ACC TTC AAC CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT 294
ALA LEU ASP GLU THR LEU LEU ASP GLU PHE TYR ILE GLU LEU ASP GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU SER CYS VAL
GCT TTG GAT GAG ACC CTT CTA GAT GAA TTC TAC ATC GAA CTT GAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAG TCC TGT GTG 369
MET GLN GLU VAL GLY VAL ILE GLU SER PRO LEU MET TYR GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL ARG LYS TYR PHE GLN
ATG CAG GAA GTG GGG GTG ATA GAG TCT CCC CTG ATG TAC GAG GAC TCC ATC CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA 444
ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER SER CYS ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG
AGA ATC ACT CTA TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC TCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA 519
SER PHE SER LEU SER ILE ASN LEU GLN LYS ARG LEU LYS SER LYS GLU
TCC TTC TCT TTA TCA ATC AAC TTG CAA AAA AGA TTG AAG AGT AAG GAA TGA GACCTGGTACAACACGGAAATGATTCTTATA 601
GACTAATACAGCAGCTCACACTTCGACAAGTTGTGCTCTTTCAAAGACCCTTGTTTCTGCCAAAACCATGCTATGTTTGAATCAAATGTGTCAAGTGT 700
TTTCAGGAGTGTTAAGCAACATCCTGTTTCAGCTGTATGGGCACTAGTCCCTTACAGATGACCATGCTGATGGATCTATTCTATTTATTTAAATCTT 799
TATTTAGTTAACTATCTATAGGGCTTAAATTAGTTTTGTTTCATATTATATTATGTGAACTTTTACATTGTGAATTGTGTAACAAAACATGTTCTTTAT 898
ATTTATTATTTTGCCTTGTTTATTAAATTTTACTATAG

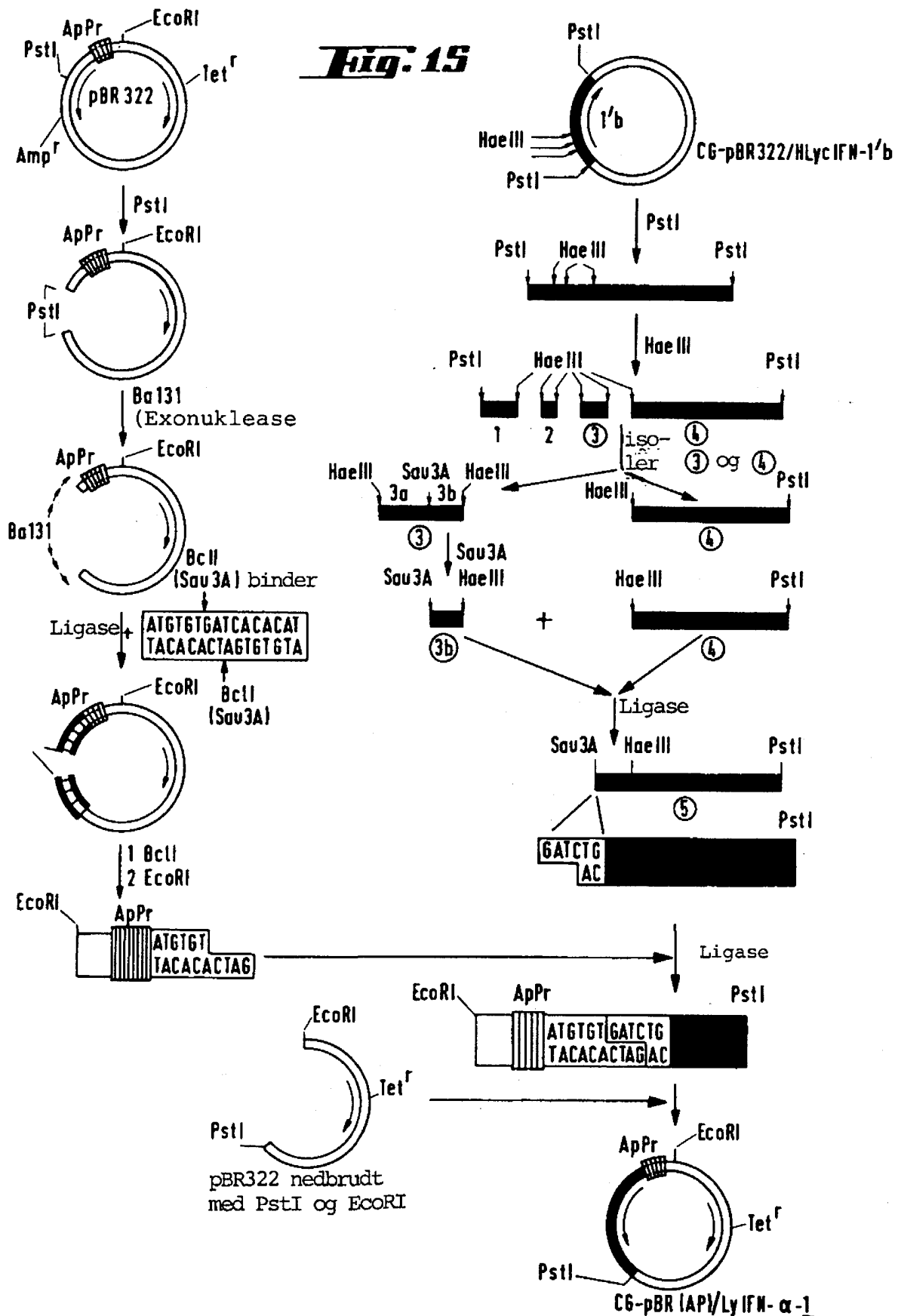
DANNELSE AF CG-pBR(AP)/LyIFN- α -1 REKOMBINANT DNAApPr: β -LACTAMASE KOPIERINGSKONTROLOMRÅDE**Fig. 15**

Fig. 16

CG-pBR(AP)/LyIFN- α -1

PROMOTOR β -LACTAMASE MET

...GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTAATG

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN MET GLY ARG ILE SER
TGT GAT CTG CCT CAG ACC CAC AGC CTG GGT AAT AGG AGG GCC TTG ATA CTC CTG GCA CAA ATG GGA AGA ATC CCC 144

PRO PHE SER CYS LEU LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLY PHE PRO GLN GLU GLU PHE ASP GLY ASN GLN PHE GLN LYS
CCT TTC TCC TGC CTG AAG GAC AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GAT GGC AAC CAG TTC CAG AAG 219

ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR LYS ASP SER SER ALA
GCT CAA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ACC TTC AAT CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT 294

THR TRP GLU GLN SER LEU LEU GLU LYS PHE SER THR GLU LEU ASN GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
ACT TGG GAA CAG AGC CTC CTA GAA AAA TTT TCC ACT GAA CTT AAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAA GCC TGC GTG 369

ILE GLN GLU VAL GLY VAL GLU GLU THR PRO LEU MET ASN VAL ASP SER ILE LEU ALA VAL LYS LYS TYR PHE GLN
ATA CAG GAG GTT GGG GTG GAA GAG ACT CCC CTG ATG AAT GTG GAC TCC ATC CTG GCT GTG AAG AAA TAC TTC CAA 444

ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG
AGA ATC ACT CTT TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA 519

SER PHE SER LEU SER LYS ILE PHE GLN GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU
TCC TTC TCT TTA TCA AAA ATT TTT CAA GAA AGA TTA AGG AGG AAG GAA TGA AACCTGTTTCAACATGGAAATGATCTGTATT 601

GACTAATACACCAGTCCACACTTCTATGACTTCTGCCATTTCAAAGACTCATTTCTCCTATAACCACCGCATGAGTTGAATCAAAATTTTCAGATCTTT 700

TCAGGAGTGTAAGGAAACATCATGTTTACCTGTGCAGGCACTAGTCCTTTACAGATGACCATGCTGATAGATCTAATTATCTATCTATTGAAATATTTA 799

TTTATTTATTAGATTTAAATTATTTTGTCCATGTAATATTATGTGTACTTTTACATTGTGTTATATCAAAATATGTTATTTATTTAGTCAATATAT 898

TATTTTCTTTTATTAATTTTACTATTAAACTTCTTATATTATTTGTTTATTG...

Fig. 17

DANNELSE AF REKOMBINANT DNA PLASMID CG-pBR(AP)/
LYIFN- α -3

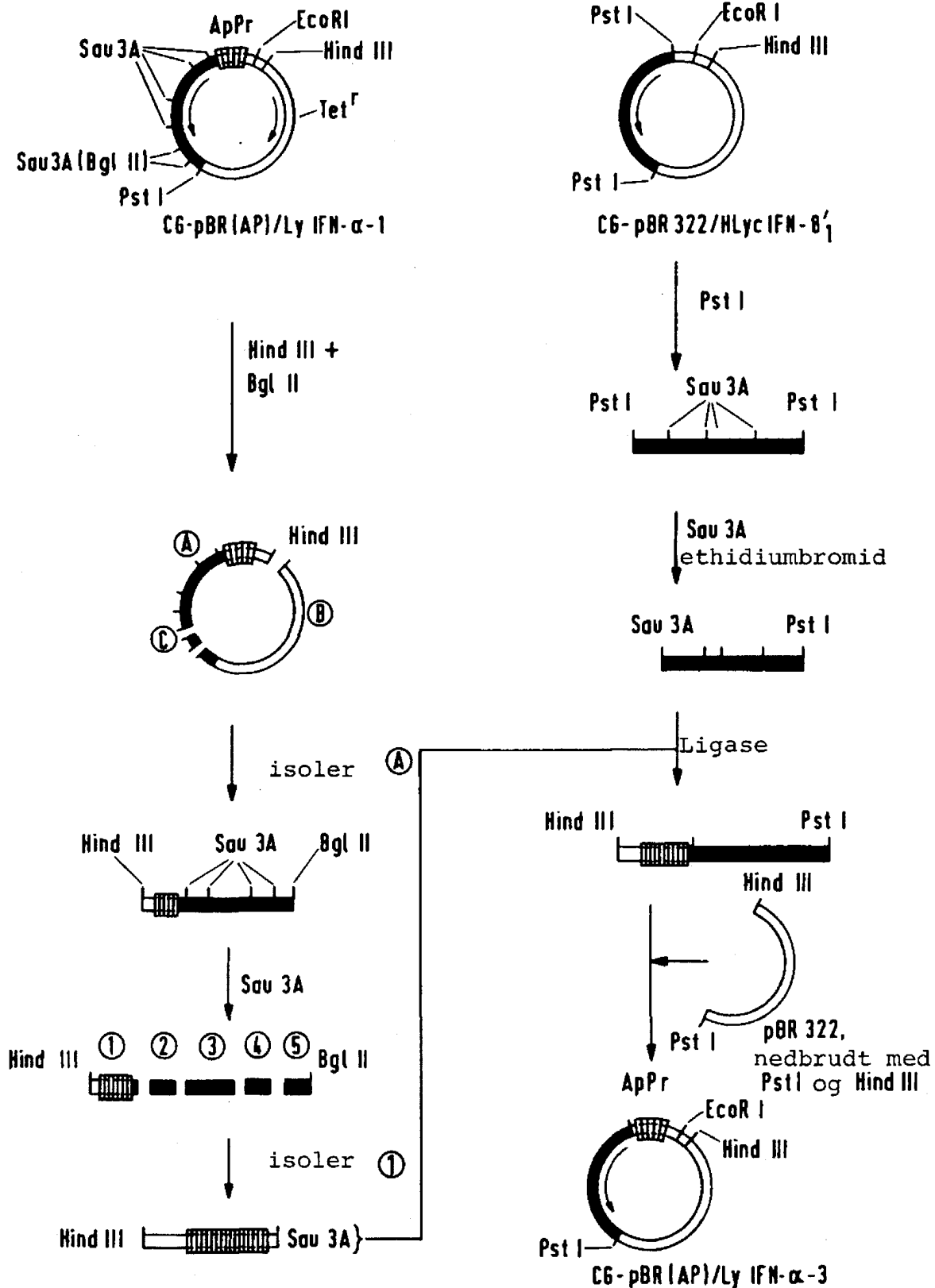


Fig. 1B

CG-pBR(AP)/LyIFN- α -3

PROMOTOR β -LACTAMASE MET

...GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAATG

CYS ASP LEU PRO GLU THR HIS SER LEU ASP ASN ARG ARG THR LEU MET LEU LEU ALA GLN MET SER ARG ILE SER
TGT GAT CTC CCT GAG ACC CAC AGC CTG GAT AAC AGG AGG ACC TTG ATG CTC CTG GCA CAA ATG AGC AGA ATC TCT 144

PRO SER SER CYS LEU MET ASP ARG HIS ASP PHE GLY PHE PRO GLN GLU GLU PHE ASP GLY ASN GLN PHE GLN LYS
CCT TCC TCC TGT CTG ATG GAC AGA CAT GAC TTT GGA TTT CCC CAG GAG GAG TTT GAT GGC AAC CAG TTC CAG AAG 219

ALA PRO ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU LEU ILE GLN GLN ILE PHE ASN LEU PHE THR THR LYS ASP SER SER ALA
GCT CCA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG CTG ATC CAG CAG ATC TTC AAC CTC TTT ACC ACA AAA GAT TCA TCT GCT 294

ALA TRP ASP GLU ASP LEU LEU ASP LYS PHE CYS THR GLU LEU TYR GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU ALA CYS VAL
GCT TGG GAT GAG GAC CTC CTA GAC AAA TTC TGC ACC GAA CTC TAC CAG CAG CTG AAT GAC TTG GAA GCC TGT GTG 369

MET GLN GLU GLU ARG VAL GLY GLU THR PRO LEU MET ASN ALA ASP SER ILE LEU ALA VAL LYS LYS TYR PHE ARG
ATG CAG GAG GAG AGG GTG GGA GAA ACT CCC CTG ATG AAT GCG GAC TCC ATC TTG GCT GTG AAG AAA TAC TTC CGA 444

ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER PRO CYS ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG
AGA ATC ACT CTC TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC CCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA 519

SER LEU SER LEU SER THR ASN LEU GLN GLU ARG LEU ARG ARG LYS GLU
TCC CTC TCT TTA TCA ACA AAC TTG CAA GAA AGA TTA AGG AGG AAG GAA TAA CACCTGGTCCAACATGAAACAATTCTTATTG 601

ACTCATATACCAAGGTCACGCTTTTCATGAATTCTGCCATTTCAAAGACTCTCACTTCTGCTATACTATGACCATGCTGATAAACTGATTTATCTATTTA 700

AATATTTATTTAGCTATTTCATAAGATTTAAATTATTTTTGTTTCATATAACATCATGTGCATCTTTACACTGTGGTTAGTGTAATAAAACATGTTCCCTTA 799

TATTTACTCAAATTCATTATTTT...

Fig. 19CG-pBR(AP)/LyIFN- α -2PROMOTOR β -LACTAMASE MET

...GAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTAATG

CYS ASP LEU PRO GLN THR HIS SER LEU GLY ASN ARG ARG ALA LEU ILE LEU LEU ALA GLN MET ARG ARG ILE SER
TGT GAT CTG CCT CAG ACT CAC AGC CTG GGT AAC AGG AGG GCC TTG ATA CTC CTG GCA CAA ATG CGA AGA ATC TCT 144

PRO PHE SER CYS LEU LYS ASP ARG HIS ASP PHE GLU PHE PRO GLN GLU GLU PHE ASP ASP LYS GLN PHE GLN LYS
CCT TTC TCC TGC CTG AAG GAC AGA CAT GAC TTT GAA TTC CCC CAG GAG GAG TTT GAT GAT AAA CAG TTC CAG AAG 219

ALA GLN ALA ILE SER VAL LEU HIS GLU MET ILE GLN GLN THR PHE ASN LEU PHE SER THR LYS ASP SER SER ALA
GCT CAA GCC ATC TCT GTC CTC CAT GAG ATG ATC CAG CAG ACC TTC AAC CTC TTC AGC ACA AAG GAC TCA TCT GCT 294

ALA LEU ASP GLU THR LEU LEU ASP GLU PHE TYR ILE GLU LEU ASP GLN GLN LEU ASN ASP LEU GLU SER CYS VAL
GCT TTG GAT GAG ACC CTT CTA GAT GAA TTC TAC ATC GAA CTT GAC CAG CAG CTG AAT GAC CTG GAG TCC TGT GTG 369

MET GLN GLU VAL GLY VAL ILE GLU SER PRO LEU MET TYR GLU ASP SER ILE LEU ALA VAL ARG LYS TYR PHE GLN
ATG CAG GAA GTG GGG GTG ATA GAG TCT CCC CTG ATG TAC GAG GAC TCC ATC CTG GCT GTG AGG AAA TAC TTC CAA 444

ARG ILE THR LEU TYR LEU THR GLU LYS LYS TYR SER SER CYS ALA TRP GLU VAL VAL ARG ALA GLU ILE MET ARG
AGA ATC ACT CTA TAT CTG ACA GAG AAG AAA TAC AGC TCT TGT GCC TGG GAG GTT GTC AGA GCA GAA ATC ATG AGA 519

SER PHE SER LEU SER ILE ASN LEU GLN LYS ARG LEU LYS SER LYS GLU
TCC TTC TCT TTA TCA ATC AAC TTG CAA AAA AGA TTG AAG AGT AAG GAA TGA GACCTGGTACAACACGGAAATGATTCTTATA 601

GACTAATACAGCAGCTCACACTTCGACAAGTTGTGCTCTTTCAAAGACCCTTGTTTCTGCCAAAACCATGCTATGTTTTGAATCAAATGTGTCAAGTGT 700

TTTCAGGAGTGTTAAGCAACATCCTGTTTCAGCTGTATGGGCACTAGTCCCTTACAGATGACCATGCTGATGGATCTATTCATCTATTTATTTAAATCTT 799

TATTTAGTTAACTATCTATAGGGCTTAAATTAGTTTTGTTTCATATTATATTATGTGAACCTTTTACATTGTGAATTGTGTAACAAAAACATGTTCTTTAT 898

ATTTATTATTTTGCCTTGTTTATTAAATTTTACTATAG...

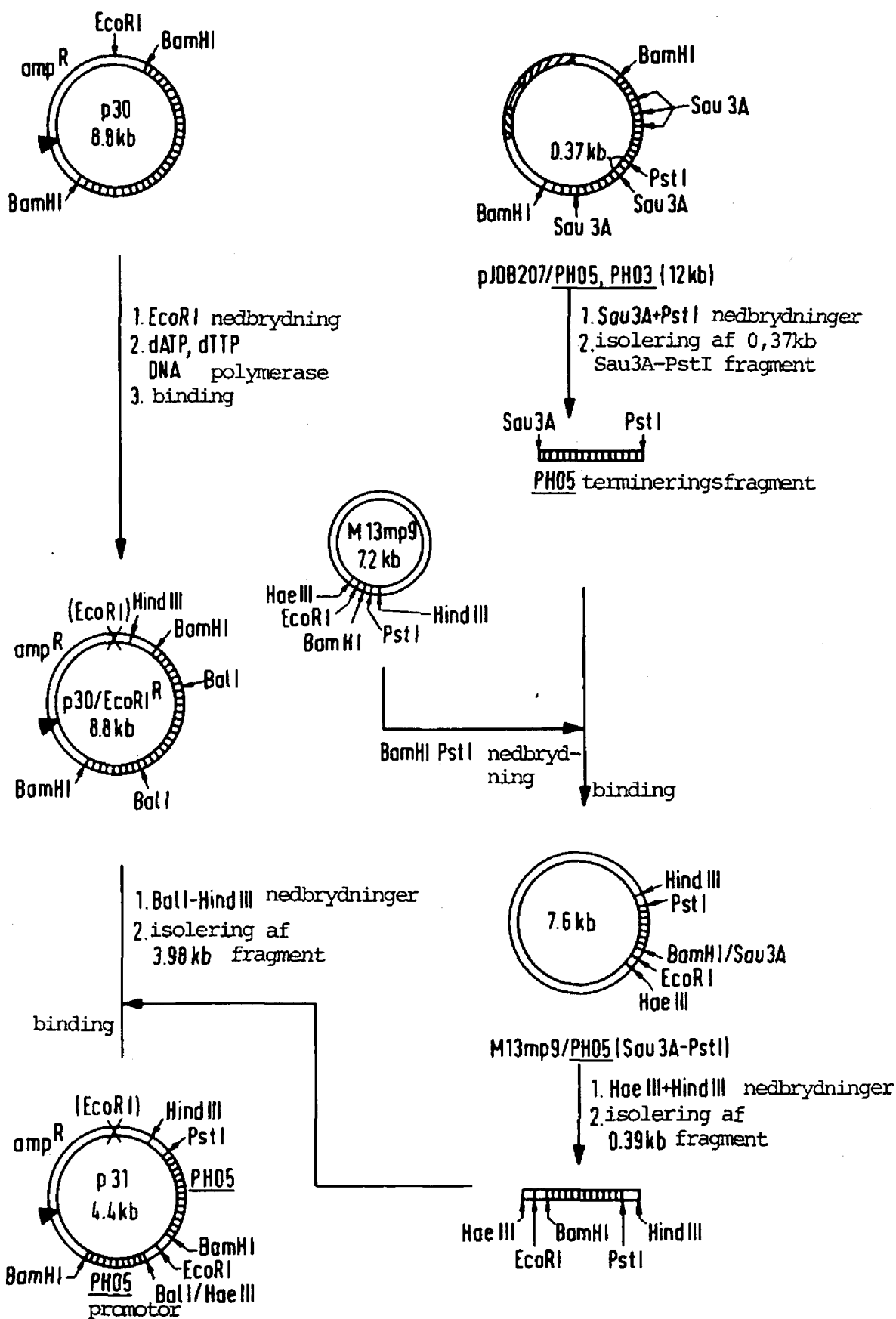
Fig. 20DANNELSE AF KOPIERINGSPLASMID p31

Fig. 21

NUKLEOTIDSEKvens FOR SAU3A-PstI PH05 TRANSSKRPTIONS-
TERMINERINGSFRAGMENTET

GATCCTGGTACGTTCTCAAGGTGCTCGTGTCTACACCGAAAAATTCCAATGTTCTAACG

ACACCTACGTCAGATACGTCATTAACGATGCTGTTGTTCCAATTGAAACCTGTTCCACTG

GTCCAGGGTTCTCTTGTAATCAATGACTTCTACGACTATGCTGAAAAGAGAGTAGCCG

GTACTGACTTCCTAAAGGTCTGTAACTCAGCAGCGTCAGTAACTCTACTGAATTGACCT

TCTACTGGGACTGGAACACTACTCATTACAACGCCAGTCTATTGAGACAATAGTTTTGTA

TAACTAAATAATATTGGAACTAAATACGAATACCCAAATTTTTTATCTAAATTTTGCCG

AAAGATTAAATCTGCA

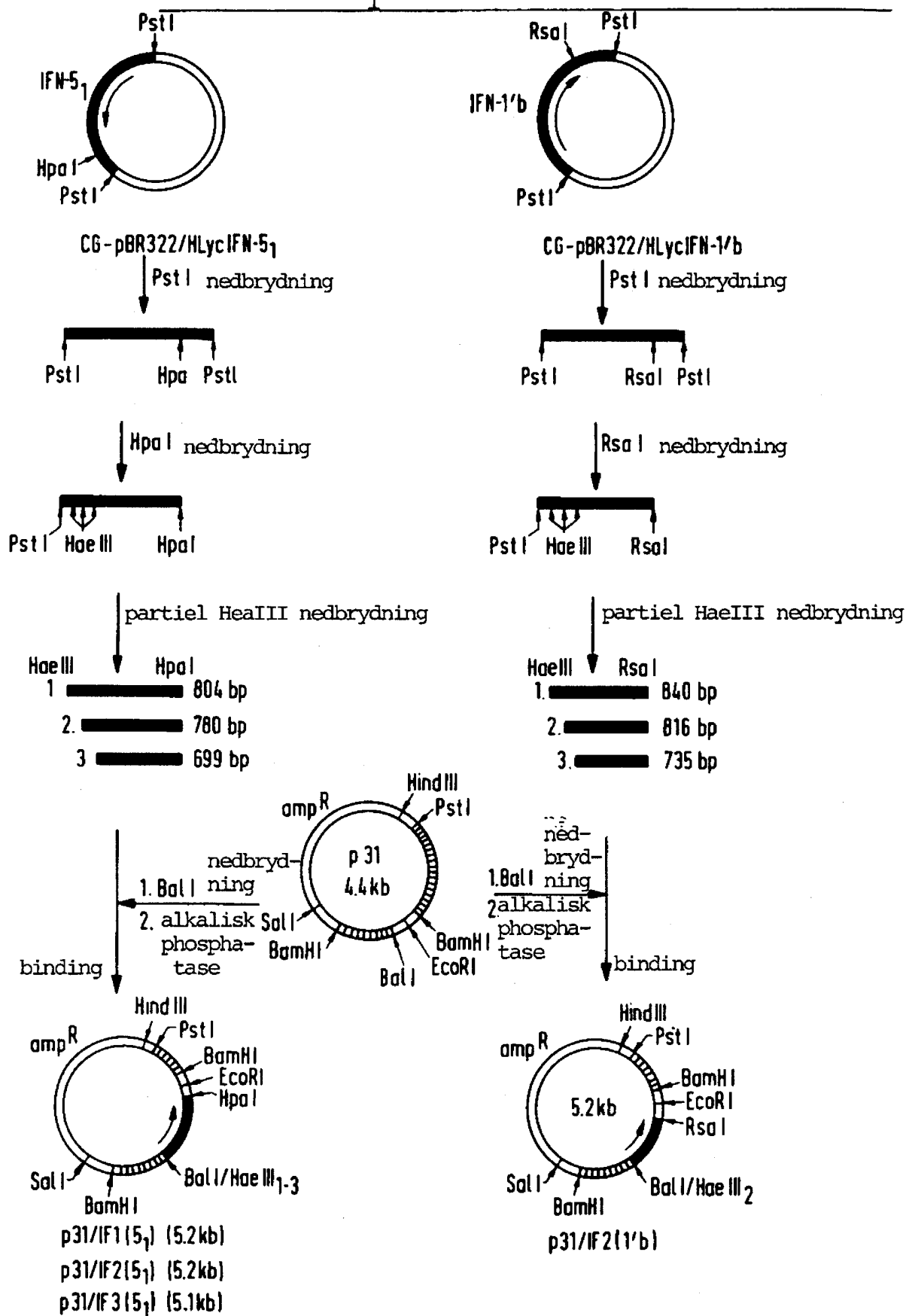
Fig. 22 INDFØRING AF IFN-5₁- OG IFN-1'_b-KODNINGSSÆKVENSER I PLASMID p31

Fig. 23

DANNELSE AF KOPIERINGSPLASMID p31/IF(8')

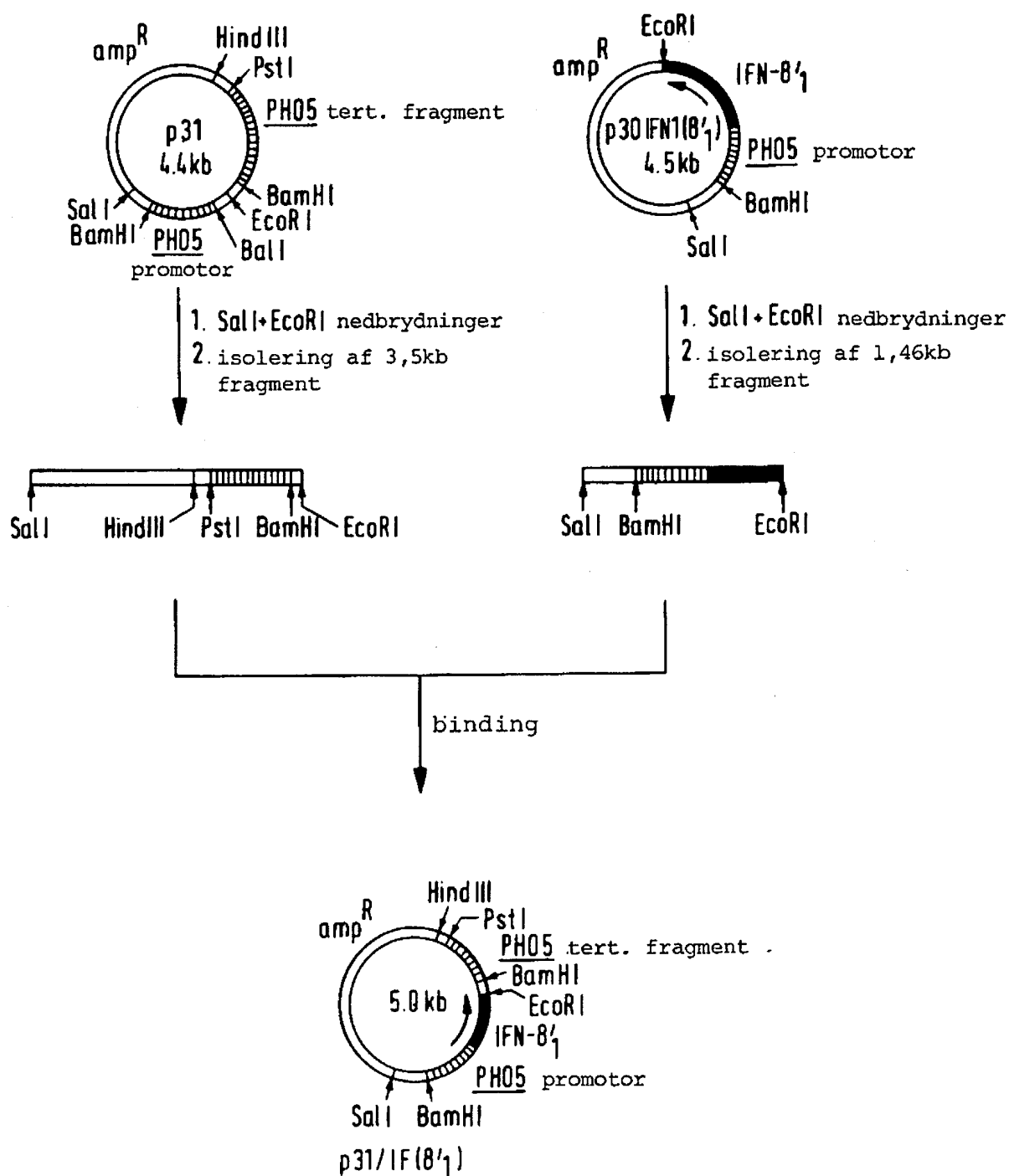


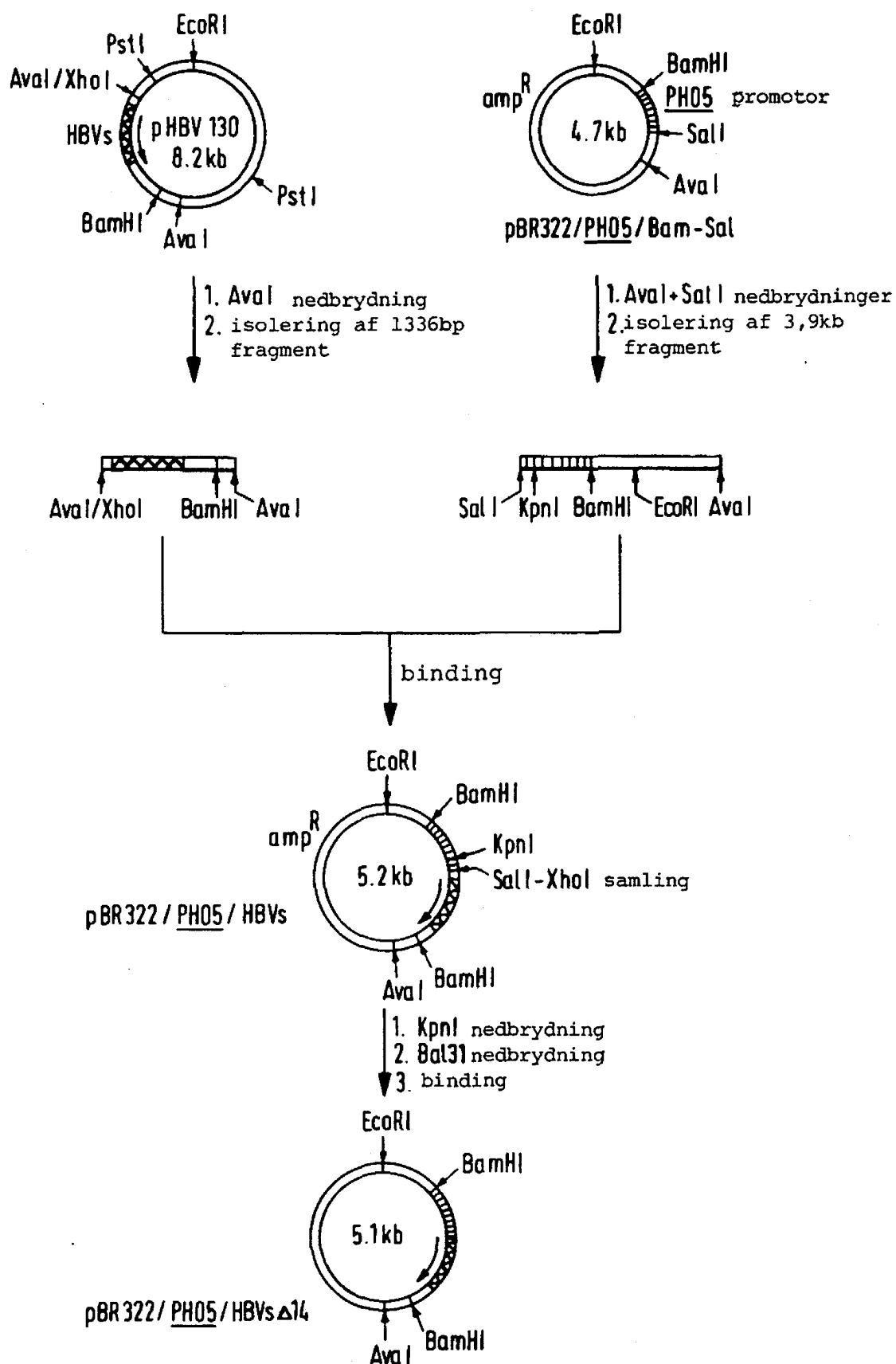
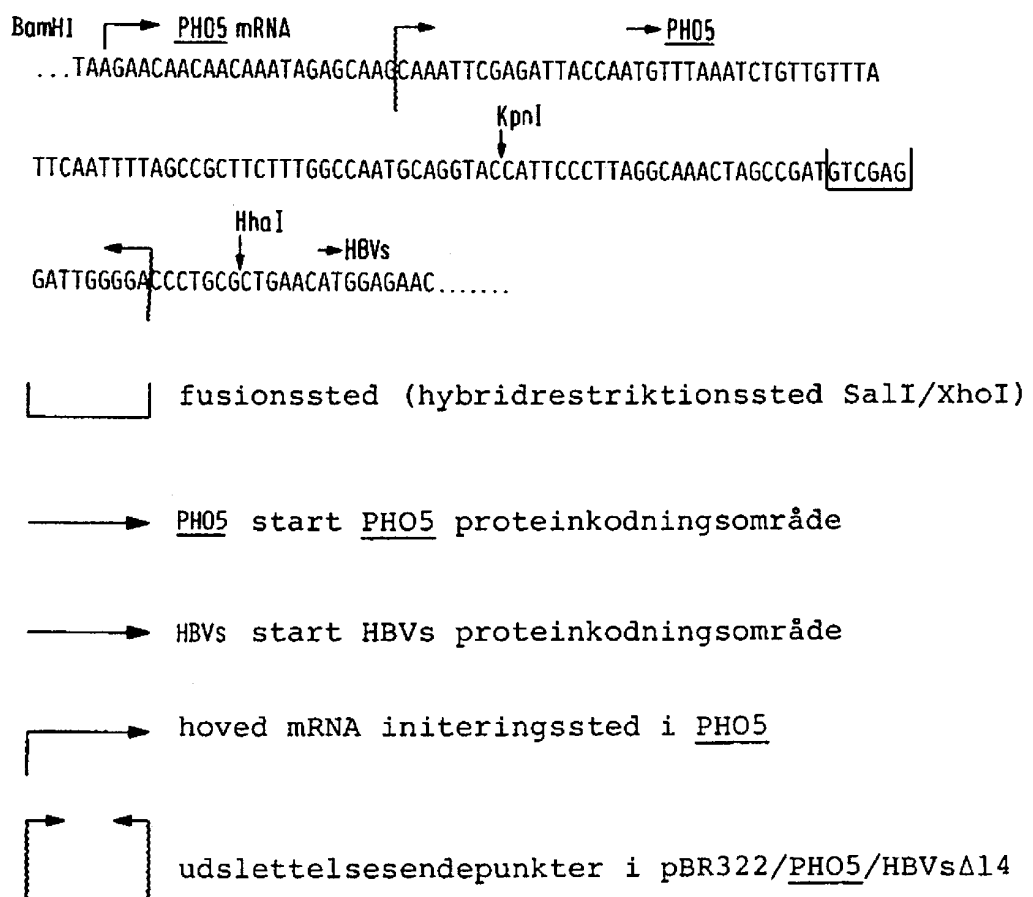
Fig. 24 DANNELSE AF EN KORREKT PH05-HBV_s SAMLING

Fig. 25

Sekvensarrangement efter PHO5 promotor- og HBVs protein-
kodningsområdefusion (plasmid pBR322/PHO5/HBVs)



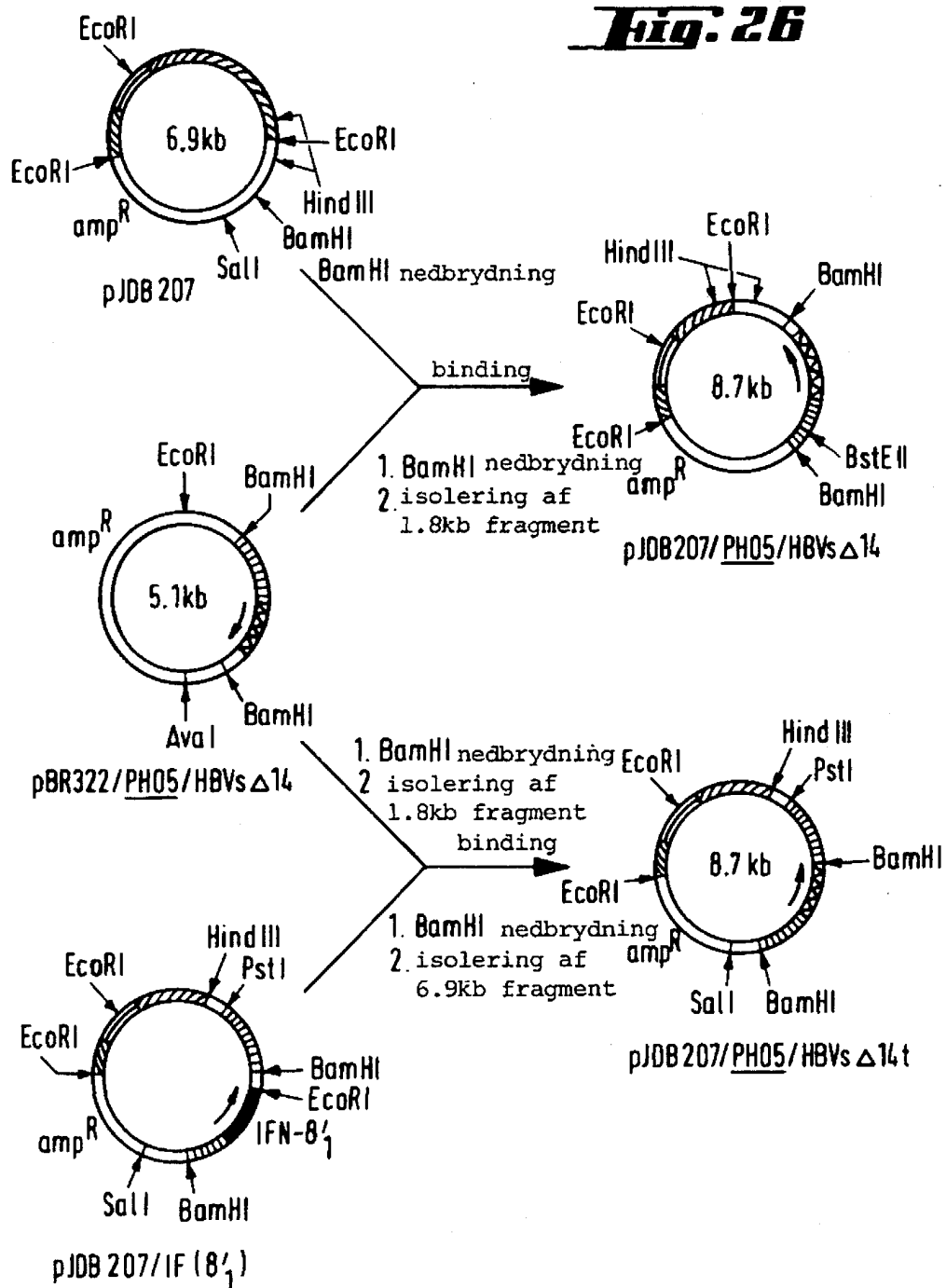
DANNELSE AF PLASMIDER pJDB 207/PH05/HBV Δ 14 OG pJDB 207/PH05/HBV Δ 14t**Fig. 26**

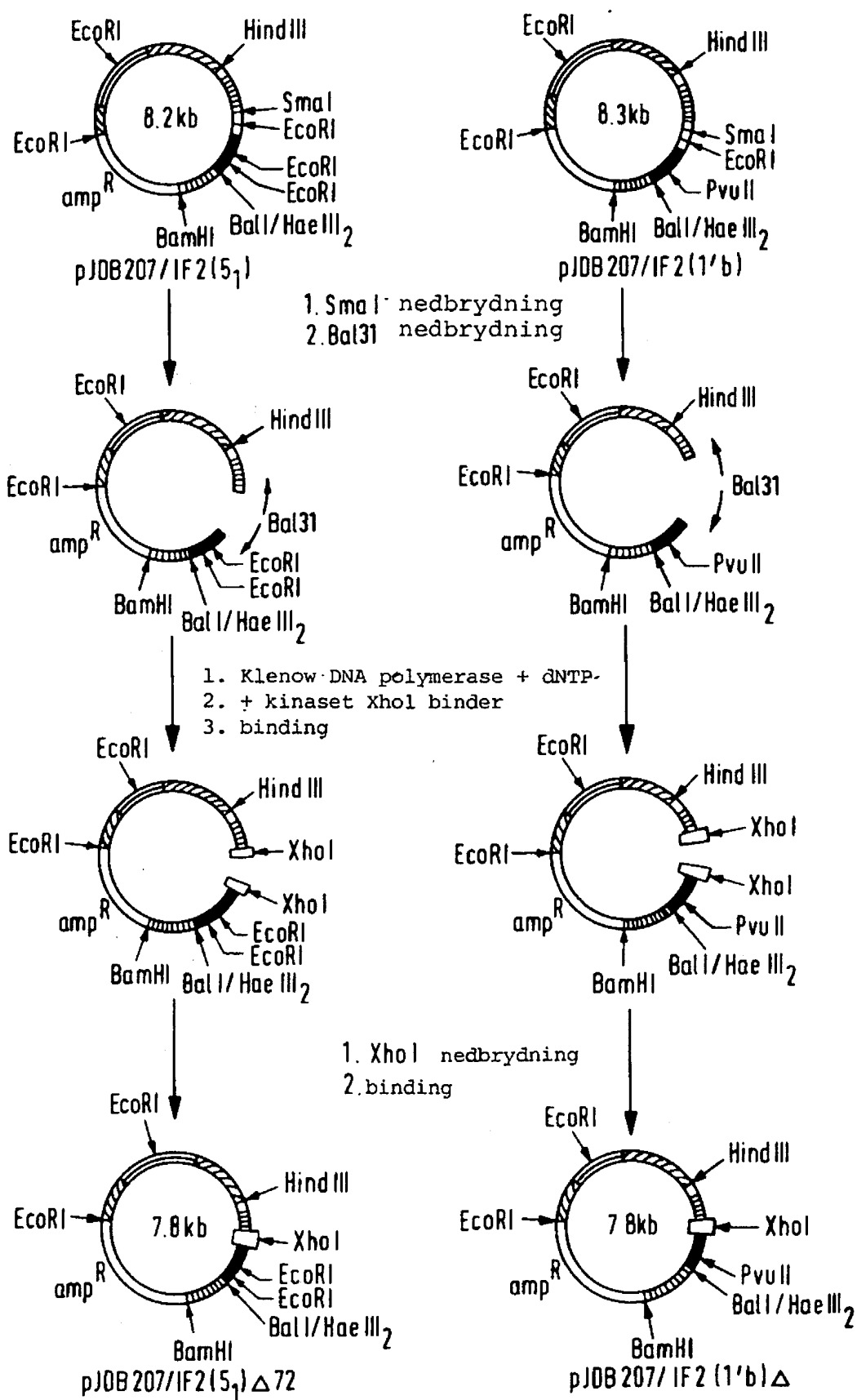
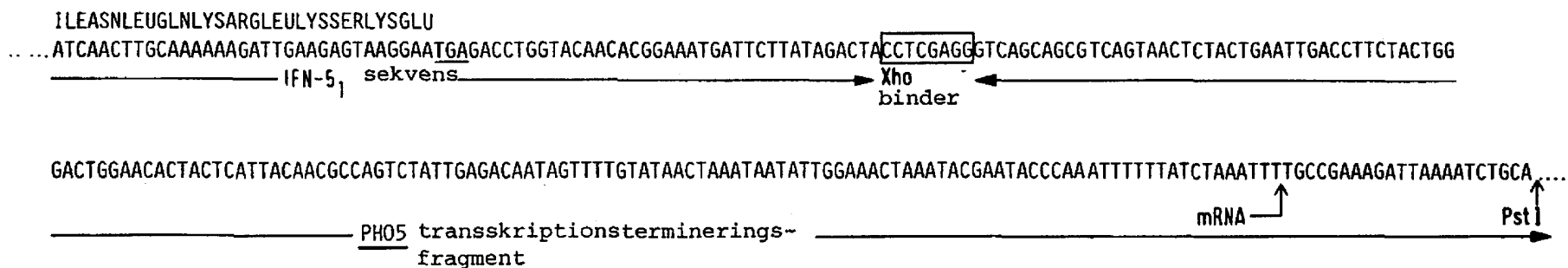
Fig. 27

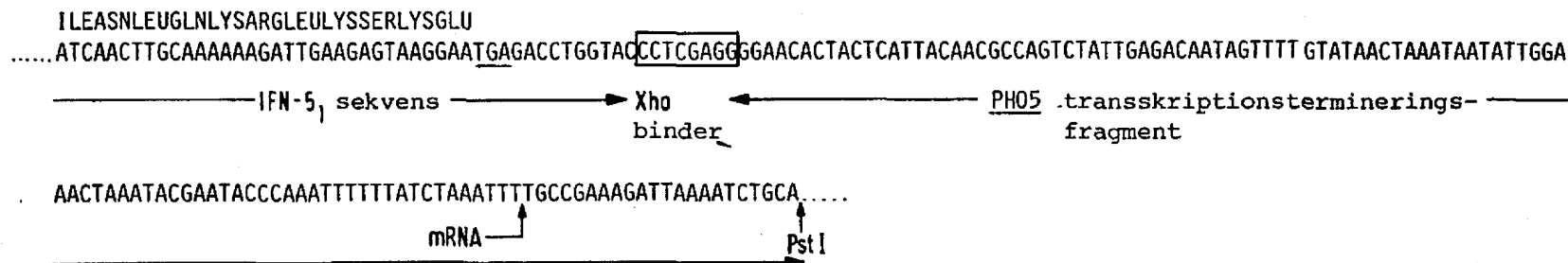
Fig. 28

Nukleotidsekvens i kloner pJDB207/IF2(5₁)Δ72 og pJDB207/IF2(5₁)Δ82 omkring den nye samling (Xho binder) mellem det 3'-ikketranslaterede område i IFN-5₁ og PHO5 transskriptionstermineringsområdet

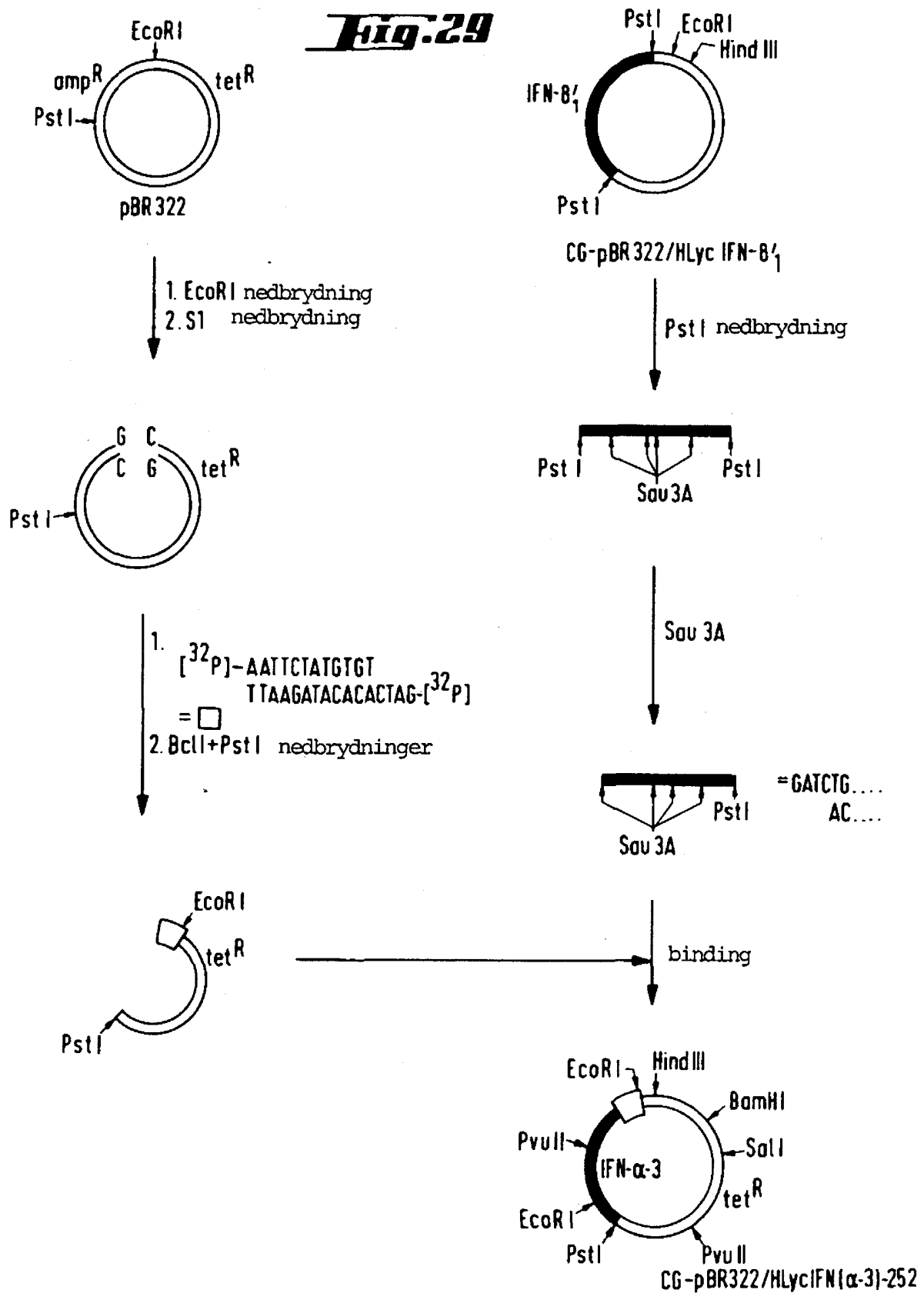
a) pJDB207/IF2(5₁)Δ72:



b) pJDB207/IF2(5₁)Δ82:



DANNELSE AF HYBRIDPLASMID CG-pBR322/HLycIFN(α -3)-252 INDEHOLDENDE
ET FLYTBART HUMANT LYMPHOBLASTOID INDSAT IFN- α -3 cDNA

Fig. 29

STRUKTUREN AF HYBRIDPLASMIDERNE CG-pBR322/HLYcIFN(α -2)-261
 OG CG-pBR322/HLYcIFN(α -1)-258

Fig. 30

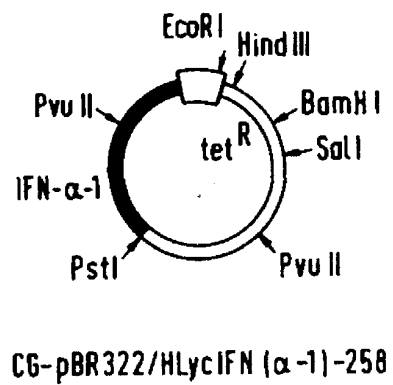
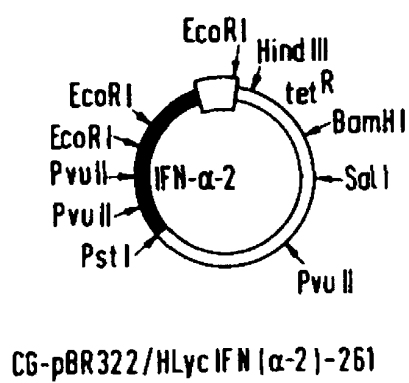


Fig. 31

UDSLETTEELSE AF PHO5 SIGNALSEKVENSEN I KOPIERINGS-
PLASMID p31

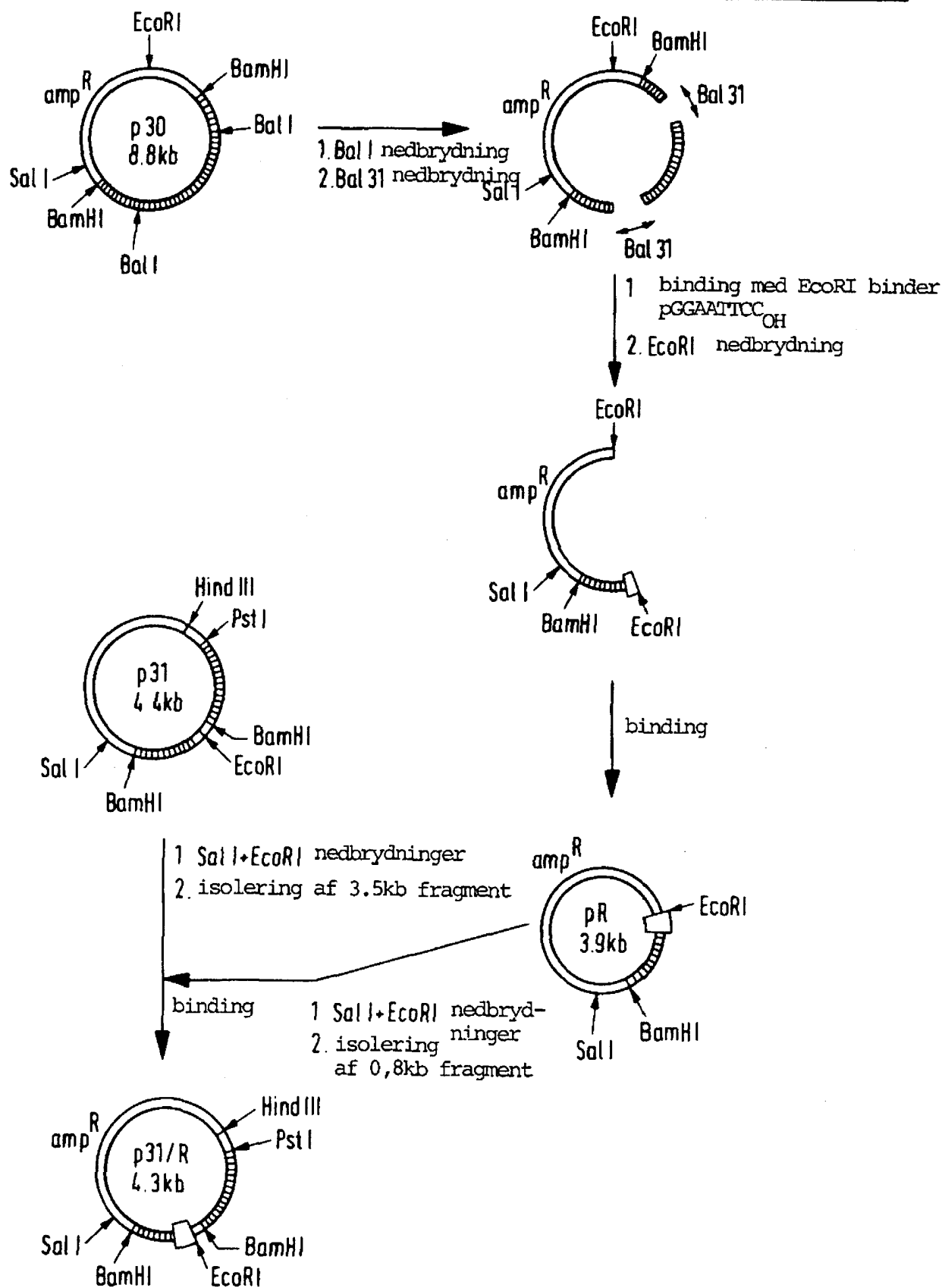
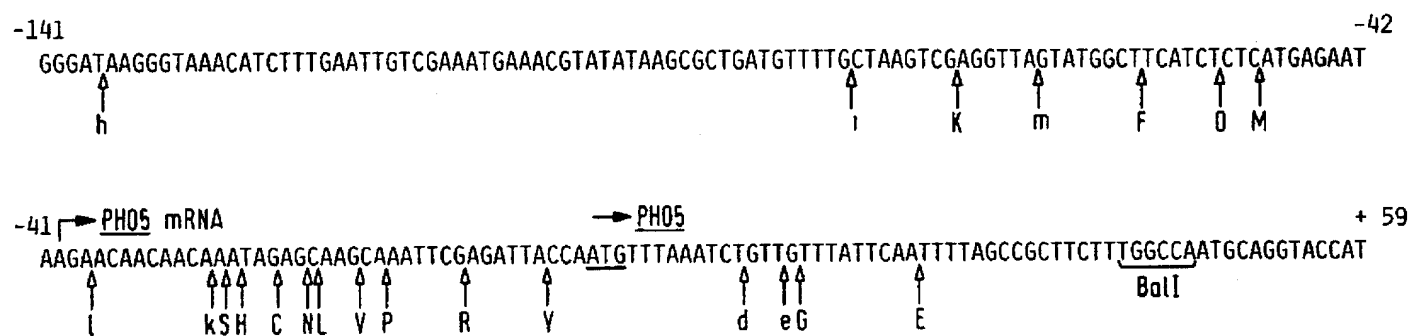


Fig. 32

SAMLING AF Bal31 UDSLETTelser I PHO5 OMRÅDET MED EcoRI BINDERE VED PILENE



→ PHO5 startsted for PHO5 proteinkodningsområde

└→ PHO5 mRNA hoved PHO5 mRNA initieringssted

↑ slutpunkt for Bal31 udslettelse (fra Bal I restriktionssted) og stilling for EcoRI binderaddition

Fig. 33

Nukleotidsekvens i BamHI-EcoRIrestriktionsfragment indeholdende
PHO5/R promotorområdet

6

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT

ATGTGCGCTGCTTAAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA

GGTAAAAGGTTATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA

CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAAAGAGTT

AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG

CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT

CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT

GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG

CTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAAATAGAGCAAGCAAATTCGGG

Fig. 34

Nukleotidsekvens i BamHI-EcoRIrestriktionsfragmentet indeholdende
PHO5/Y promotorområdet

G

ATCCGAAAGTTGTATTCAACAAGAATGCGCAAATATGTCAACGTATTTGGAAGTCATCTT

ATGTGCGCTGCTTTAATGTTTTCTCATGTAAGCGGACGTCGTCTATAAACTTCAAACGAA

GGTAAAAGGTTCATAGCGCTTTTTCTTTGTCTGCACAAAGAAATATATATTAAATTAGCA

CGTTTTCGCATAGAACGCAACTGCACAATGCCAAAAAAGTAAAAGTGATTAAAAGAGTT

AATTGAATAGGCAATCTCTAAATGAATCGATACAACCTTGGCACTCACACGTGGGACTAG

CACAGACTAAATTTATGATTCTGGTCCCTGTTTTCGAAGAGATCGCACATGCCAAATTAT

CAAATTGGTCACCTTACTTGGCAAGGCATATACCCATTTGGGATAAGGGTAAACATCTTT

GAATTGTCGAAATGAAACGTATATAAGCGCTGATGTTTTGCTAAGTCGAGGTTAGTATGG

CTTCATCTCTCATGAGAATAAGAACAACAACAATAGAGCAAGCAAATTCGAGATTAGG

INDSÆTTELSE AF LYMPHOPLASTOID IFN- α -3 DNA I PLASMID p31/R

Fig. 35

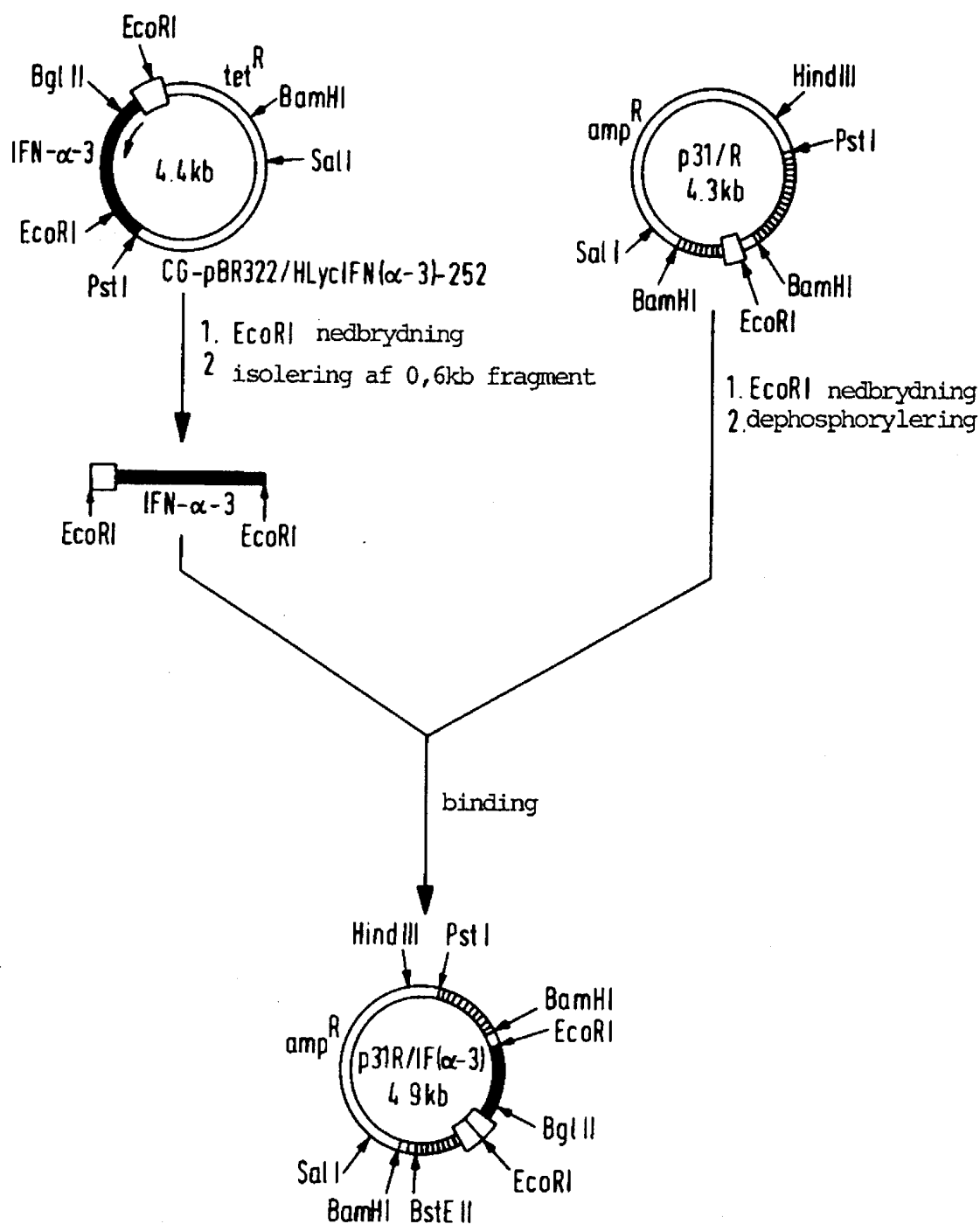


Fig. 36

INDSÆTTELSE AF LYMPHOBASTOID IFN- α -2 DNA I PLASMID p31/R

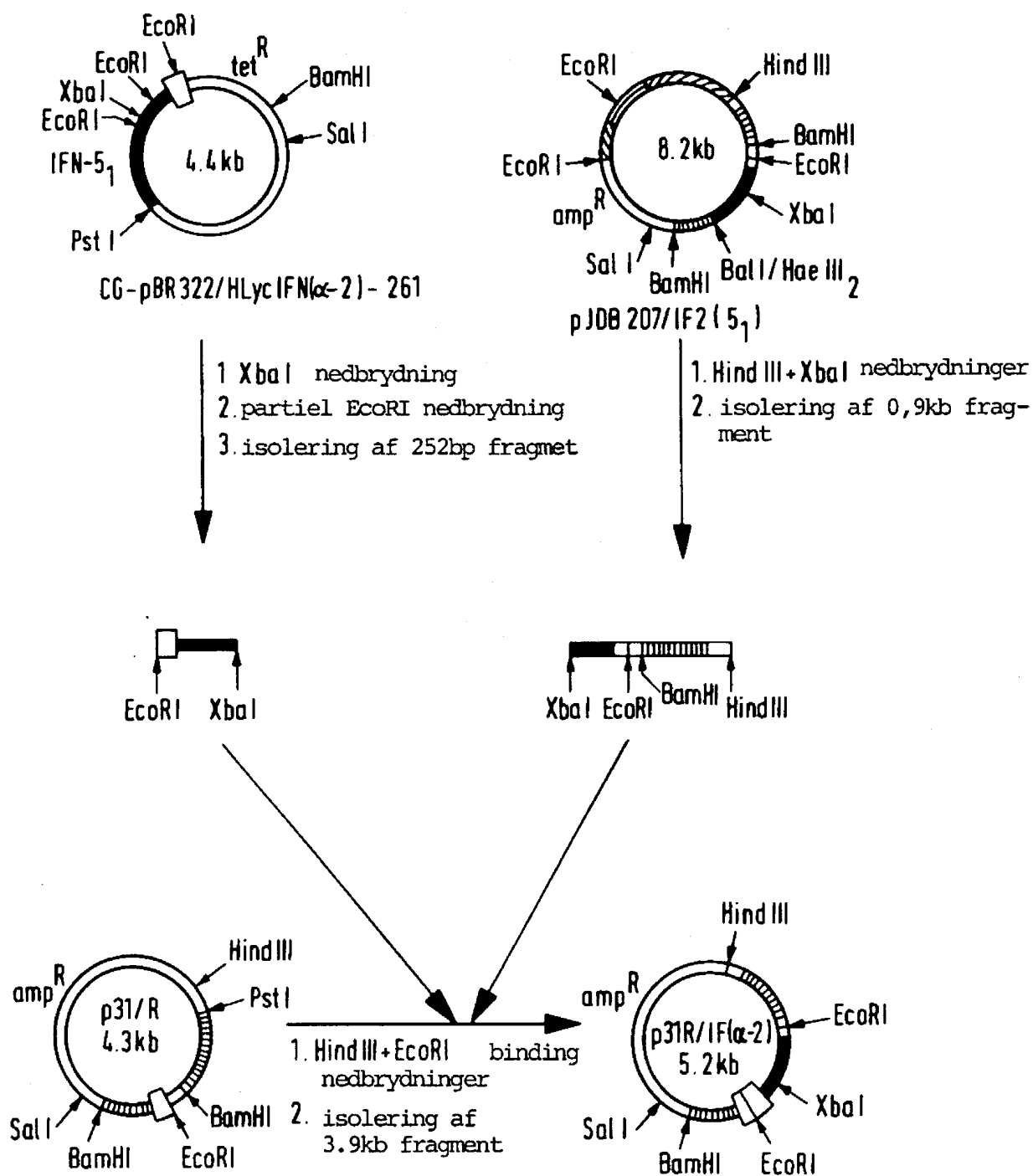


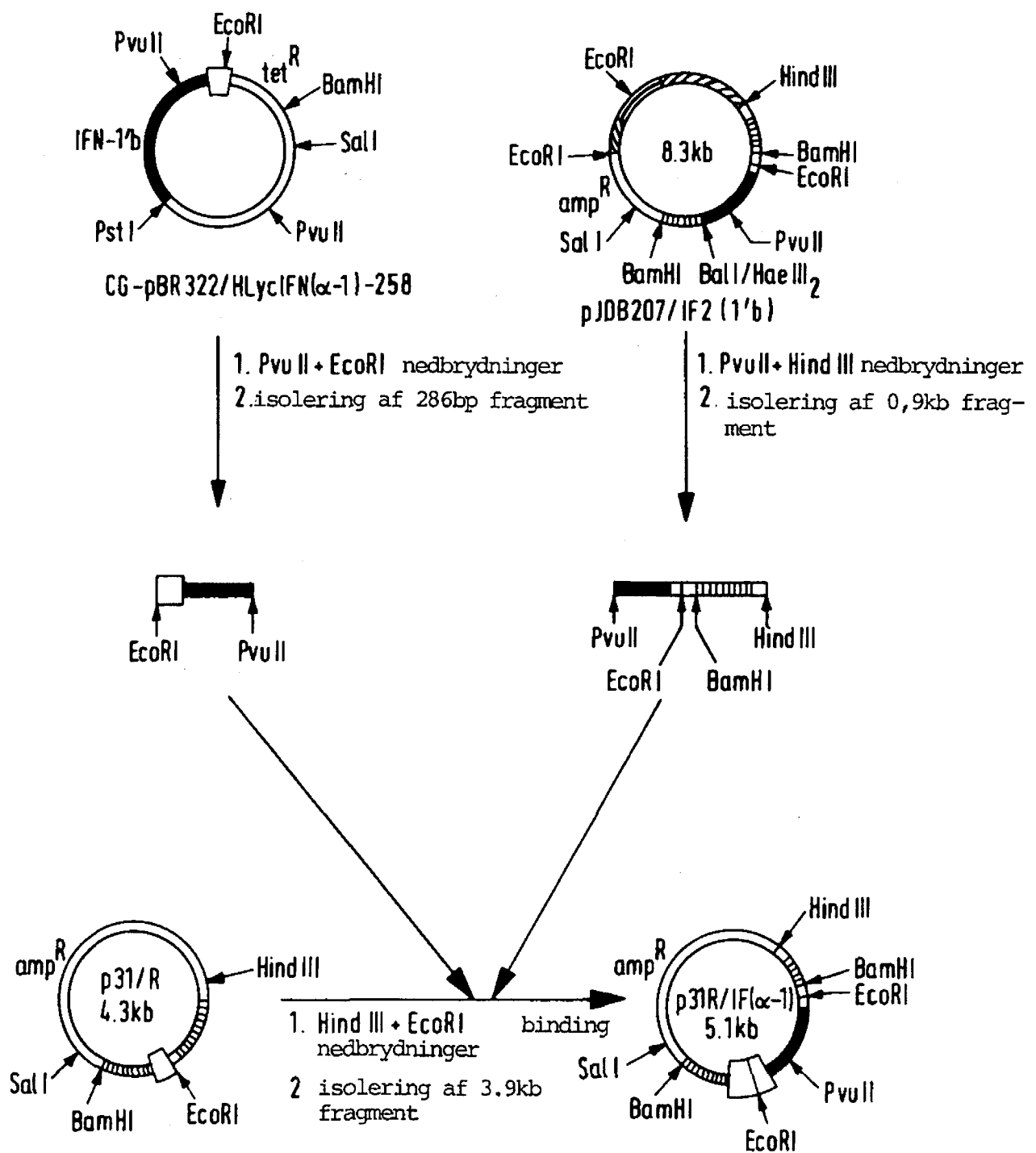
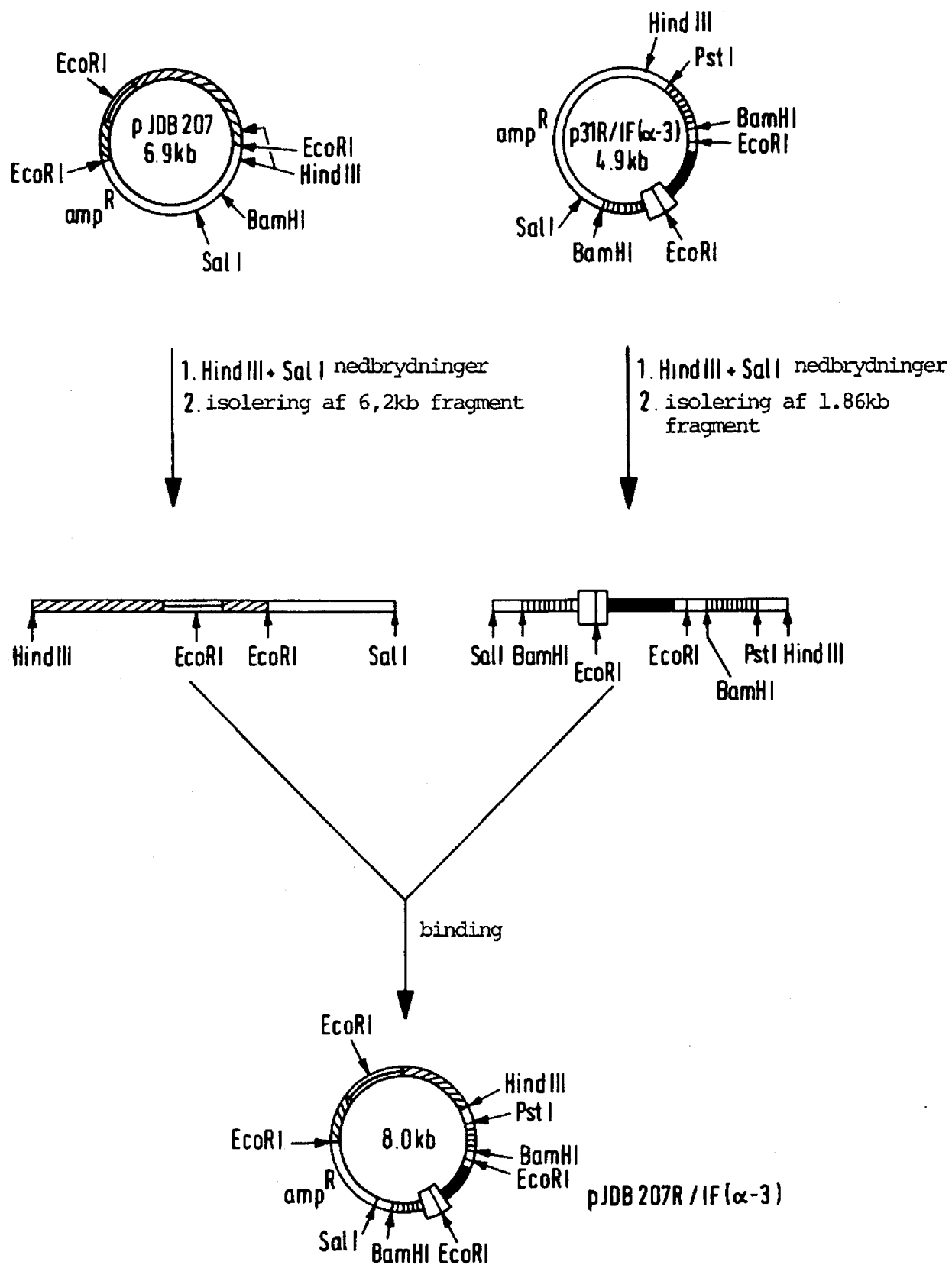
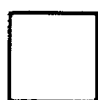
Fig. 31INDSÆTTELSE AF LYMPHOBASTOID IFN- α -1 DNA I PLASMID p31/R

Fig. 3BDANNELSE AF KOPIERINGSPLASMID pJDB207R/IF (α -3)

TILLÆG

SYMBOLER ANVENDT I FIG. 10-14 HAR FØLGENDE BETYDNINGER:



aminosyreombytning



nukleotidombytning



sekvens ikke til stede i kendt teknik



polyadenyleringssteder i kendt teknik



fjernelse af et nukleotid

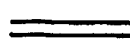


indføring af et nukleotid

I de pågældende figurer refererer de angivne symboler til den nærmestliggende kendte teknik som anført i eksempel 10.

I de øvrige figurer har de anvendte symboler følgende betydninger:

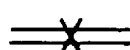
 HBV's gen

 pBR322 sekvenser

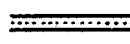
 gær kromosomal DNA afledt fra PHO3, PHO5 område

 gær 2μ plasmid DNA

 gær kromosomal DNA afledt fra LEU 2 område

 fjernelse af et restriktionssted

 humant lymphoblastoidt interferongen

 gær kromosomal DNA afledt fra TRP I område

 fjernelse i pBR 322

 restriktionssted

 transskriptionsretning

 binder DNA stræk

amp^R ampicillinresistent gen

tet^R tetracyclinresistent gen