

(19) DANMARK



(12) PATENTSKRIFT

(11) 168016 B1

Patentdirektoratet
TAASTRUP

(21) Patentansøgning nr.: 6108/84

(51) Int.Cl.5

C 07 K 13/00

C 12 N 15/23

(22) Indleveringsdag: 19 dec 1984

(41) Alm. tilgængelig: 27 jun 1985

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 17 jan 1994

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 26 dec 1983 JP 246456/83 25 jul 1984 JP 154713/84

(73) Patenthaver: *KYOWA HAKKO KOGYO CO. LTD.; 6-1, Ohtemachi Itchome; Chiyoda-ku; Tokyo, JP

(72) Opfinder: Seiga *Itoh; JP, Susumu *Sekine; JP, Akiko *Saito; JP, Moriyuki *Sato; JP

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

(54) Derivat af humant interferon-gamma-polypeptid

(56) Fremdragne publikationer

(57) Sammendrag:

6108-84

Et derivat af humant interferon- γ -polypeptid, et rekombinant plasmid, hvori et DNA-fragment, der koder for polypeptidet, er inkorporeret, og en fremgangsmåde til fremstilling af derivatet af humant interferon- γ -polypeptid under anvendelse af en mikroorganisme indeholdende plasmidet.

Den foreliggende opfindelse angår et hidtil ukendt derivat af humant interferon- γ -polypeptid, der er ejendommeligt ved det i kravets kendetegnende del anførte.

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

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

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

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

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

Det blev rapporteret, at deletion af 11 aminosyrer fra den C-terminale ende af IFN- α nedsatte den specifikke aktivitet til en tredjedel [A.E. Franke, et al.: DNA 1, 223 - 230 (1982)], hvorimod addition af 18 aminosyrer til den N-terminale ende af IFN- α ikke ændrer den specifikke aktivitet [R.M. King et al.: J. Gen. Virol. 64, 1815 - 1818 (1983)].

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

På tegningen viser

fig. 1 flow sheetet til konstruktion af pGBD-1,

fig. 2 flow sheetet til konstruktion af pGSB-6 og pGVA-4,

fig. 3 flow sheetet til konstruktion af pGKV-13,

5 fig. 4 flow sheetet til konstruktion af pGWC-10,

fig. 5 flow sheetet til konstruktion af pGVL-10,

fig. 6 flow sheetet til konstruktion af pGVM101 og

fig. 7 flow sheetet til konstruktion af pGWE4.

Den foreliggende opfindelse omhandler et rekombinant
10 plasmid, hvori en DNA, der koder for et hidtil ukendt
derivat af humant IFN- γ , er inkorporeret, en mikroorga-
nisme indeholdende plasmidet, en fremgangsmåde til frem-
stilling af et hidtil ukendt derivat af humant IFN- γ -
polypeptid under anvendelse af mikroorganismen og deri-
15 vatet af det humane IFN- γ -polypeptid som sådant.

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

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

Basesekvensen for IFN- γ -DNA i pIFN γ -G4 blev bestemt ved metoden af Maxam og Gilbert [Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 560 (1977)] og er vist i tabel 1.

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

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

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

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

Derpå nedbrydes pGBD-1 med *SinI* og *BamHI*, og et fragment på ca. 850 bp renses ved lav-geleringstemperatur-agarose-gelelektroforese (LGT-metoden) [L. Wieslander: Analytical Biochemistry 98, 305 (1979)]. pKYP10 nedbrydes med *ClaI* og *BamHI*, og et fragment på ca. 4,3 kb renses. De således opnåede DNA-fragmenter og en syntetisk DNA vist på fig. 2, som koder for Tyr som den tredje aminosyre, ligeres med T4-DNA-ligase til opnåelse af pGSB-6. Derpå nedbrydes pGSB-6 med *ClaI* og underkastes ifyldningsreaktion med DNA-polymerase I og ligeringsreaktion med T4-DNA-ligase til opnåelse af pGVA-4. Den samme procedure gentages med undtagelse af, at man anvender den syntetiske DNA, der er vist på fig. 3, som koder for Ser, som den første og tredje aminosyre til opnåelse af plasmid pGVK-13, som koder for et derivat, hvori første og tredje aminosyre fra den N-terminale ende i IFN- γ , Cys, er erstattet med Ser.

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

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

Nedbrydning af DNA med restriktionszymer udføres sædvanligvis ved at omsætte 0,1 - 20 μ g DNA med 0,1 - 100 enheder, foretrukket 1 - 3 enheder restriktionsenzym pr. μ g DNA i en blanding af 2 - 200 mM, foretrukket

10 - 40 mM Tris-HCl (pH 6,0 - 9,5, foretrukket pH 7,0 - 8,0), 0 - 200 mM NaCl og 2 - 20 mM, foretrukket 5 - 10 mM MgCl₂ ved 20 - 70 °C (optimal temperatur afhænger af anvendte restriktionsenzymmer) i 15 minutter til 24 timer. Reaktionen standses sædvanligvis ved opvarmning til 55 - 75 °C i 5 - 30 minutter eller også ved at inaktivere restriktionsenzymet med reagenset, såsom phenol eller diethylpyrocarbonat.

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

15 Ligering af DNA-fragmenterne udføres med 0,3 - 10 enheder T4-DNA-ligase i en blanding af 2 - 200 mM, foretrukket 10 - 40 mM Tris-HCl (pH 6,1 - 9,5, foretrukket 7,0 - 8,0), 2 - 20 mM, foretrukket 5 - 10 mM MgCl₂, 0,1 - 10 mM, foretrukket 0,5 - 2,0 mM ATP og 1 - 50 mM, foretrukket 5 - 10 mM dithiothreitol ved 1 - 37 °C, foretrukket 3 - 20 °C i 15 minutter til 72 timer, 20 foretrukket 2 - 20 timer. Den rekombinante plasmide DNA, der dannes ved ligeringsreaktionen, indføres i Escherichia coli ved transformationsmetoden ifølge Cohen, et al. [S.N. Cohen, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 2110 (1972)], om nødvendigt. Isolering af den rekombinante plasmide DNA fra Escherichia coli, der bærer 25 DNA'en, udføres ved den metode, der er beskrevet i eksempel 1, eller ved metoden af Birnboim, et al. [H. C. Birnboim, et al.: Nucleic Acids Res. 7, 1513 (1979)]. Plasmid DNA nedbrydes med 1 - 10 typer restriktionsendo- 30 nucleaser, og kløvningsstederne undersøges ved agarosegellektroforese eller polyacrylamidgelelektroforese. Endvidere undersøges, om nødvendigt, basesekvensen for DNA ved metoden af Maxam-Gilbert [Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 560 (1977)].

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

Escherichia coli K-12 HB101 transformeres med et plasmid, såsom pGVA-4, og en Escherichia coli stamme bærende
5 pGVA-4 udvælges fra de ampicillinresistente kolonier (i det følgende benævnt Ap^R). Den Escherichia coli stamme, der bærer pGVA-4, dyrkes i et medium til fremstilling af et derivat af IFN- γ -polypeptid i de dyrkede celler.

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

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

15 Som nitrogenkilde kan anvendes NH₄Cl, (NH₄)₂SO₄, casaminsyre, gærekstrakt, polypepton, kødekstrakt, Bactotrypton, majsstøbevæske, etc.

Desuden kan næringsstoffer, såsom K₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl, MgSO₄, vitamin B₁ og MgCl₂ anvendes.

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

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

Bestemmelse af humant IFN- γ udføres efter metoden af

Armstrong [J.A. Armstrong, et al.: Appl. Microbiol. 21, 723 - 725 (1971)].

Opfindelsen forklares nærmere ved hjælp af de efterfølgende eksempler.

5 EKSEMPEL 1

Konstruktion af plasmid pGBD-1 med BamHI-kløvningssted nedenstrøms for IFN- γ -genet:

I dette eksempel blev 2 μ g plasmid pIFN γ -G4 [3,6 kilobaser (i det følgende kaldt Kb)] opløst i 50 μ liter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 50 mM NaCl (i det følgende benævnt "Y-50 pufferopløsning"). Derpå blev 4 enheder restriktionsenzym PvuII (produkt fra Takara Shuzo Co.; restriktionsenzymene i det følgende er alle produkter fra Takara Shuzo Co., med mindre andet er anført) tilsat og nedbrydningsreaktionen blev udført ved 37 °C i 2 timer. 1 μ g DNA-fragment (3,6 Kb) pIFN γ -G4 blev rensat ved LGT-metoden. 0,1 μ g af DNA-fragmentet og 5 pmol 5'-phosphoryleret BamHI-linker (5'-pCCGGATCCGG-3': produkt fra Collaborative Research, Inc.) blev ligeret ved 4 °C i 18 timer med 2 enheder T4-ligase (produkt fra Takara Shuzo Co.; hvilket også gælder det følgende) i 20 μ liter af en pufferopløsning bestående af 20 mM Tris-HCl (pH 7,6), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 0,5 mM ATP (i det følgende benævnt "T4-ligasepufferopløsning").

Escherichia coli HB101 [Boliver, et al.: GENE 2, 75 (1977)] blev transformeret under anvendelse af den således opnåede rekombinante plasmide DNA ved metoden af Cohen, et al. [S.N. Cohen, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972), hvilken metode anvendes til

transformation af *Escherichia coli* i det følgende] til opnåelse af en AP^R-koloni. Plasmid DNA blev isoleret fra transformanten ved den kendte metode [H.C. Birnboim, et al.: *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513 (1979), hvilken metode anvendes til isolering af plasmid DNA i følgende]. DNA'en blev nedbrudt med restriktionsendonucleaser, såsom BamHI, og dens struktur blev analyseret for at erkende, at rekombinant plasmid pGBD-1, hvori BamHI-linker var indsat i PvuII-stedet i pIFN γ -G4, var opnået. *Escherichia coli* stamme bærende plasmid pGBD-1 er deponeret i Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology (i det følgende benævnt FERM) som *Escherichia coli* IGBD-1 (FERM BP-394).

EKSEMPEL 2

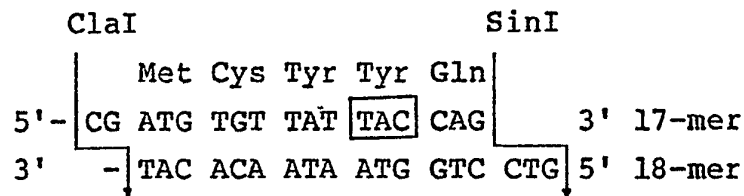
15 Konstruktion af rekombinant plasmid pGVA-4 kodende for 3-Tyr-IFN γ :

pGBD-1 opnået i eksempel 1 blev behandlet ved følgende metode til fjernelse af modifikationen af DNA og danne SinI-kløvningssted i plasmidet. *Escherichia coli* GM31 (thr leu dcm his thi ara lac galK, galT, xyl mtl str tonA) [Marinus, et al.: *Molec. Gen. Genet.* 127, 47 - 55 (1973)] blev transformeret med pGBD-1 ved en konventionel metode. Der blev fremstillet en stor mængde pGBD-1 fra de således opnåede kolonier ved en konventionel metode. 6 μ g af den således opnåede pGBD-1 DNA blev opløst i 50 μ liter Y-50 pufferopløsning. 10 enheder SinI (produkt fra Bio Tech Co.) blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev der tilsat NaCl til en slutkoncentration på 100 μ M og 10 enheder BamHI. Nedbrydningsreaktionen blev udført ved 37 °C i 3 timer. Der blev opnået ca. 0,8 μ g DNA-fragment på ca. 850 basepar (i det følgende benævnt bp) indeholdende størstedelen af human IFN γ -

DNA fra reaktionsopløsningen ved LGT-metoden.

Separat blev 3 μ g pKYP10 fremstillet ved den metode, der er beskrevet i japansk offentliggjort uundersøgt patentansøgning nr. 110600/83, opløst i 40 μ liter (totalvolumen) af en pufferopløsning bestående af 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 100 mM NaCl (i det følgende benævnt "Y-100 pufferopløsning") og 5 enheder ClaI (produkt fra Boehringer Mannheim GmbH) og BamHI blev tilsat. Nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Fra reaktionsopløsningen opnåedes ved LGT-metoden ca. 1,8 μ g DNA-fragment på ca. 4,3 kb indeholdende tryptophan-promotor (P_{trp}).

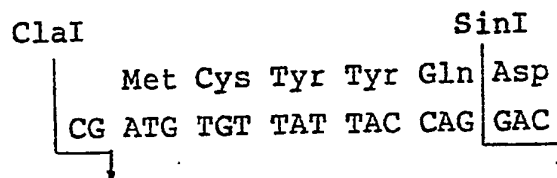
Modent humant IFN- γ -polypeptid har den N-terminale struktur Cys-Tyr-Cys-. For at ændre den tredje aminosyre (Cys) til Tyr og for at tilvejebringe en initieringscodon (ATG) nødvendig til udtrykkelse lige før den første Cys, blev følgende DNA-linker syntetiseret.



To enkeltkædede DNA'er af 17-mer og 18-mer blev syntetiseret ved en konventionel triestermetode [R. Crea. et al: Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 5865 (1978)]. Derpå blev 2 μ g af den 17-mere og af den 18-mere DNA opløst i 40 μ liter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA og 1 mM ATP. 30 enheder T4-polynucleotidkinase (produkt fra Takara Shuzo Co.) blev tilsat og phosphoryleringsreaktion udført ved 37 °C i 60 minutter.

0,4 μ g af *SinI*-*BamHI*-fragmentet på ca. 850 bp opnået som i det foregående og afledt fra pGBD-1 og 1,0 μ g af *ClaI*-*BamHI*-fragmentet på ca. 4,3 Kb af udtrykkelsesvektoren pKYP10 opnået som i det foregående blev opløst i 25 μ l T4-ligase-pufferopløsning. Ca. 0,1 μ g af DNA-kædedanneren nævnt i det foregående blev sat til blandingen efterfulgt af tilsætning af 6 enheder T4-DNA-ligase. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer.

10 *Escherichia coli* HB101 blev transformeret under anvendelse af den opnåede rekombinante plasmidblanding til opnåelse af en Ap^R -koloni. Et plasmid pGSB-6 som vist på fig. 2 blev isoleret fra dyrkningsvæsken for kolonien. Strukturen af pGSB-6 blev bekræftet ved nedbrydning med *EcoRI*, *ClaI* og *BamHI* og agarosegelelektroforese. 15 Det blev bekræftet ved metoden af Maxam-Gilbert [A.M. Maxam, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA 74 560 (1977)], at basesekvensen rundt om *ClaI*-*SinI* i plasmidet pGSB-6 er

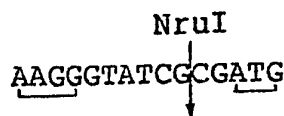


20 Det humane IFN- γ -polypeptid, der indkodes af pGSB-6 (derivatet kaldes i det følgende 3-Tyr-IFN- γ) er klart forskelligt fra det humane IFN- γ -polypeptid derved, at den tredje aminosyre (Cys) for modent humant IFN- γ er erstattet med Tyr.

25 Derpå blev 1 μ g pGSB-6 opløst i 30 μ l (totalvolumen) Y-50 pufferopløsning, og 2 enheder *ClaI* blev tilsat. Nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 2 timer. Et DNA-fragment blev udvundet ved phenolekstraktion,

chloroformekstraktion og ethanoludfældning. DNA-fragmentet blev opløst i 30 μ liter af en opløsning bestående af 67 mM Tris-HCl (pH 8,8), 6,7 mM MgCl₂, 10 mM mercaptoethanol, 6,7 μ M EDTA, 16,6 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP og 1 mM dTTP, og 5 enheder T4-DNA-polymerase (produkt fra Takara Shuzo Co.) blev tilsat efterfulgt af ifyldningsreaktion ved 37 °C i 1 time. Et DNA-fragment blev udvundet ved phenolekstraktion, chloroformekstraktion og ethanoludfældning. 0,1 μ g af DNA-fragmentet blev opløst i 50 μ liter T4-ligaase-pufferopløsning. To enheder T4-ligase blev tilsat og ligeringsreaktion udført ved 4 °C i 16 timer.

Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den således opnåede DNA-blanding, og plasmid DNA, pGVA-4, blev udvundet fra den dannede Ap^R-koloni. Strukturen af pGVA-4 blev bestemt ved kløvning med NruI, BamHI og EcoRI. Basesekvensen mellem SD og ATG for pGVA-4 blev bekræftet ved metoden af Maxam og Gilbert som beskrevet i det foregående og illustreret i det følgende.



Escherichia coli stamme bærende plasmid pGVA-4 er deponeret hos FERM som Escherichia coli IGVA-4 (FERM BP-395).

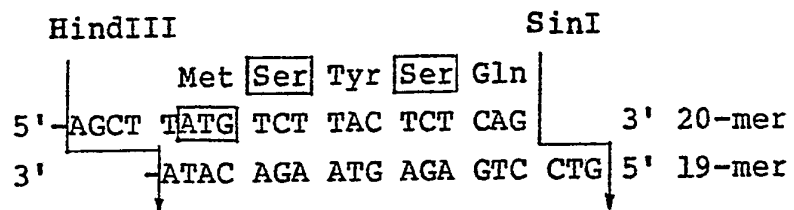
EKSEMPEL 3

Konstruktion af rekombinant plasmid pGVK-13 kodende for 1,3-Ser-IFN- γ :

6 μ g pGBD-1-DNA opnået i eksempel 1 blev opløst i 50 μ liter Y-50 pufferopløsning. 10 enheder SinI (produkt fra Bio Tec Co.) blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev NaCl tilsat

til en slutkoncentration på 100 mM, og 10 enheder BamHI blev tilsat. Nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Ca. 0,8 µg DNA-fragment på ca. 850 bp indeholdende størstedelen af den humane IFN-γ-DNA blev opnået ud fra reaktionsopløsningen ved LGT-metoden. Separat blev 3 µg pKYP-10 opløst i 40 µliter (totalvolumen) Y-100 pufferopløsning, og 5 enheder af hver af stofferne HindIII og BamHI blev tilsat. Nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Fra reaktionsopløsningen blev der opnået ca. 1,8 µg DNA-fragment med ca. 4,3 kb indeholdende P_{trp} ved LGT-metode.

Modent humant IFN-γ-polypeptid har den N-terminale struktur Cys-Tyr-Cys-. For at ændre den første og den tredje aminosyre (Cys) til Ser og til opnåelse af en initieringscodon (ATG) nødvendig til udtrykkelse lige før første Ser, blev følgende DNA-linker syntetiseret

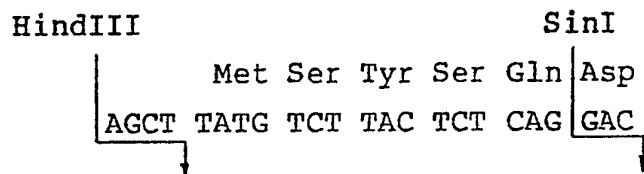


To enkeltkædede DNAer af 20-mer og 19-mer blev syntetiseret ved en konventionel triestermetode [R. Crea, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., 75, 5765 (1978)]. Derpå blev 2 µg af såvel den 20-mere som den 19-mere DNA opløst i 40 µliter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA og 1 mM ATP. 30 enheder T4-nucleotidkinase (produkt fra Takara Shuzo Co.) blev tilsat og phosphoryleringsreaktion blev udført ved 37 °C i 60 minutter.

0,4 µg af SmaI-BamHI-fragmentet på ca. 850 bp opnået i det foregående og afledt fra pGBD-1 og 1,0 µg af

HindIII-BamHI-fragmentet på ca. 4,3 kb af udtrykkelsesvektoren pKYP10 opnået i det foregående blev opløst i 25 μ liter T4-ligasepufferopløsning. Ca. 0,1 μ g af DNA-kædedanneren nævnt i det foregående blev sat til blandingen efterfulgt af tilsætning af 6 enheder T4-DNA-ligase. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer.

Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den opnåede rekombinante plasmide blanding til opnåelse af en Ap^R-koloni. Et plasmid, pGVK-13, vist på fig. 3, blev isoleret fra dyrkningsvæsken for kolonien. Strukturen af pGVK-13 blev bekræftet ved nedbrydningen med EcoRI, HindIII, ClaI og BamHI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved metoden af Maxam-Gilbert, at basesekvensen fra HindIII-sted til SinI-sted i plasmidet pGVK-13 er som følger.



Det humane IFN- γ -polypeptid indkodet af pGVK-13 (derivatet kaldes i det følgende 1,3-Ser-IFN- γ) er klart forskelligt fra det humane IFN- γ -polypeptid derved, at første og tredje aminosyre (Cys) i modent humant IFN- γ er erstattet med Ser. Escherichia coli stamme bærende plasmid pGVK-13 er deponeret hos FERM som Escherichia coli IGVK-13 (FERM BP-432).

EKSEMPEL 4

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

Escherichia coli HB101 stammer bærende rekombinante plasmider pGBD-1, pGVA-4, pGVK-13, opnået i eksempel

1 - 3, og pGWC-10 (se DK patentans. 1472/92), som kaldes IGBD-1, IGVA-4, IGVK-13 og IGWC-10, blev dyrket ved 37 °C i 18 timer i LG-medium (10 g trypton, 5 g gærekstrakt, 5 g NaCl, 2 g glucose, 1 liter vand, indstillet til pH 7,0 med NaOH). 0,2 ml af dyrkningsvæsken blev podet over i 10 ml MCG-medium (0,6% Na₂HPO₄, 0,3% KH₂PO₄, 0,5% NaCl, 0,1% NH₄Cl, 0,5% glucose, 0,5% casaminosyre, 1 mM MgSO₄, 4 µg/ml vitamin B₁, pH 7,2) og dyrkning blev udført ved 30 °C i 4 timer. Derpå blev 10 µg/ml indolacrylsyre (i det følgende benævnt IAA), som er en inducer for tryptophan-operon, tilsat og dyrkning blev fortsat i 4 timer. Dyrkningsvæsken blev centrifugeret ved 8000 omdr./min. i 10 minutter, og de høstede celler blev vasket med en pufferopløsning indeholdende 30 mM NaCl og 30 mM Tris-HCl (pH 7,5). Vaskeceller blev suspenderet i 1 ml af den i det foregående beskrevne pufferopløsning, og 5 µl af en opløsning indeholdende 200 µg lysozym og 0,25 M EDTA (ethylendiamintetraeddikesyre) blev tilsat. Blandingen fik lov at henstå ved 0 °C i 30 minutter og frysning og tøning blev gentaget 3 gange for at bryde cellerne. De brudte celler blev centrifugeret ved 15000 omdr./min. i 30 minutter til opnåelse af en overliggende væske. Mængden af interferon i den overliggende væske blev bestemt efter metoden af Armstrong [J. A. Armstrong, et al.: Appl. Microbiol. 21, 723 - 725 (1971)], hvori Sindvis-virus blev anvendt som virus, og Fl-celler afledt fra humane amnionceller blev anvendt som dyrecellerne. Resultaterne fremgår af tabel 2.

TABEL 2

Stammer	Plasmid	Produkt, som plasmidet koder for	IFN- γ (enh./ml)
IGBD-1	pGBD-1	IFN- γ	spor
IGVA-4	pGVA-4	3-Tyr-IFN- γ	9×10^4
IGVK-13	pGVK-13	1,3-Ser-IFN- γ	2×10^5
IGWC-10	pGWC-10	IFN- γ (41-7)	5×10^4
IGKA-2	pGKA-2	IFN- γ	2×10^4

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

EKSEMPEL 5

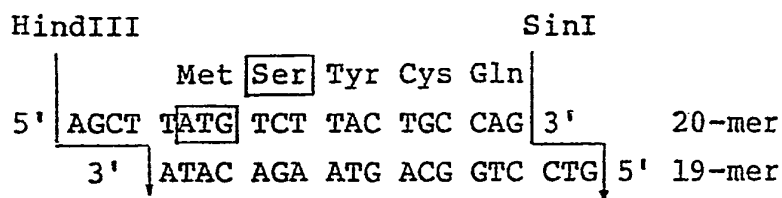
5 Konstruktion af rekombinant plasmid pGVL10, der koder for 1-Ser-IFN- γ :

6 μ g pGBD1 DNA opnået i eksempel 1 blev opløst i 50 μ liter Y-50 pufferopløsning. 10 enheder SinI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev der tilsat NaCl til en slutkoncentration
10 på 100 mM, og 10 enheder BamHI blev tilsat. Nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Der blev opnået ca. 0,8 μ g DNA-fragment med ca. 850 bp indeholdende størstedelen af den humane IFN- γ -DNA fra reaktionsopløsningen ved LGT-metoden.

15 Separat blev 3 μ g pKYP10 DNA fremstillet ved den metode, der er beskrevet i japansk offentliggjort uundersøgt patentansøgning nr. 110600/83, opløst i 40 μ liter (totalvolumen) Y-50 pufferopløsning, og 5 enheder af hvert af stofferne HindIII og BamHI blev tilsat. Nedbryd-

ningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Fra reaktionsopløsningen opnåedes ved LGT-metoden ca. 1,8 µg DNA-fragment på ca. 4,3 kb indeholdende tryptophanpromotor (P_{trp}).

- 5 Modent humant IFN- γ -polypeptid har den N-terminale struktur Cys-Tyr-Cys-. For at ændre det første Cys til Ser og give en initieringscodon (ATG), der er nødvendig til udtrykkelse, lige før det første Ser, blev følgende DNA-linker syntetiseret.

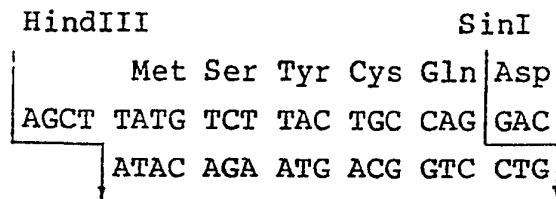


- 10 To enkeltkædede DNAer af 20-mer og 19-mer blev syntetiseret ved en konventionel triestermetode [R. Crea, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 75, 5765 (1978)]. Derpå blev 2 µg af den 20-mer og den 19-mer DNA opløst i 40 µl (totalvolumen) af en opløsning inde-
- 15 holdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA og 1 mM ATP. 30 enheder T4-polynucleotid-kinase blev tilsat og phosphoryleringsreaktion blev udført ved 37 °C i 60 minutter.

- 20 0,5 µg af SmaI-BamHI-fragmentet på ca. 850 bp opnået i det foregående og afledt fra pGBD-1 og 1,0 µg af HindIII-BamHI-fragmentet på ca. 4,3 kb af udtrykkelsesvektoren pKYP10 blev opløst i 25 µl T4-ligasepufferopløsning. Ca. 0,1 µg af DNA-kædedanneren som nævnt i det foregående blev sat til blandingen efterfulgt
- 25 af tilsætning af 6 enheder T4-DNA-ligase. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer.

Escherichia coli HB101 blev transformeret under anven-

delse af den opnåede rekombinante plasmide blanding til opnåelse af en Ap^R-koloni. Et plasmid, pGVL10, vist på fig. 5, blev isoleret fra dyrkningsmediet for kolonien. Strukturen af pGVL10 blev bekræftet ved nedbrydningen med EcoRI, ClaI, HindIII og BamHI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved metoden af Maxam-Gilbert [A. M. Maxam, et al.: Proc. Natl, Acad, Sci. USA, 74, 560 (1977)], at basesekvensen fra HindIII-stedet til SinI-stedet i plasmidet pGVL10 er som følger.



10 Det humane IFN- γ -polypeptid, som pGVL10 koder for (derivatet kaldes i det følgende l-Ser-IFN- γ) er klart forskelligt fra det humane IFN- γ -polypeptid derved, at den første Cys i modent humant IFN- γ er erstattet med Ser. Escherichia coli stamme bærende plasmid pGVL10
 15 er deponeret hos FERM som Escherichia coli IGVL10 (FERM BP-544).

EKSEMPEL 6

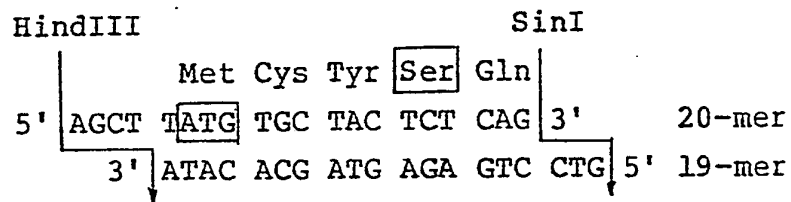
Konstruktion af rekombinant plasmid pGVML01 kodende for 3-Ser-IFN- γ :

20 6 μ g pGBD1-DNA opnået i eksempel 1 blev opløst i 50 μ liter Y-50 pufferopløsning. 10 enheder SinI blev tilsat og nedbrydningsreaktion udført ved 37 °C i 3 timer. Derpå blev der tilsat NaCl til en slutkoncentration på 100 mM, og 10 enheder BamHI blev tilsat. Nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Ca. 0,8 μ g DNA-
 25 fragment på ca. 850 bp indeholdende størstedelen af den humane IFN- γ -DNA blev opnået fra reaktionsopløsning-

gen ved LGT-metoden.

Separat blev 3 μ g pKYP10-DNA fremstillet ved metoden som beskrevet i japansk offentliggjort uundersøgt patentansøgning nr. 110600/83 opløst i 40 μ liter (totalvolumen) Y-50 pufferopløsning, og 5 enheder HindIII og BamHI blev tilsat. Nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 3 timer. Fra reaktionsopløsningen opnåedes ca. 1,8 μ g DNA-fragment på ca. 4,3 kb indeholdende tryptophan-promotor (P_{trp}) ved LGT-metoden.

10 Modent humant IFN- γ -polypeptid har den N-terminale struktur Cys-Tyr-Cys-. For at ændre den tredje aminosyre (Cys) til Ser og for at opnå en initieringscodon (ATG), der er nødvendig til udtrykkelse, lige før den første Cys, syntetiseredes følgende DNA-linker.

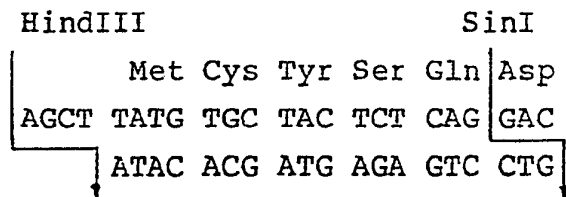


15 To enkeltkædede DNAer af 20-mer og 19-mer blev syntetiseret ved en konventionel triestermetode. Derpå blev 2 μ g af såvel den 20-mer som den 19-mer DNA opløst i 40 μ liter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA og 1 mM ATP. 30 enheder T4-poly-nucleotidkinase blev tilsat, og phosphoryleringsreaktion blev udført ved 37 °C i 60 minutter.

25 0,5 μ g af SinI-BamHI-fragmentet på ca. 850 bp opnået som i det foregående og afledt fra pGBD1 og 1,0 μ g af HindIII-BamHI-fragmentet på ca. 4,3 kb af udtrykkelsesvektoren pKYP10 blev opløst i 25 μ liter T4-ligasepufferopløsning. Ca. 0,1 μ g af DNA-linkeren som nævnt

i det foregående blev sat til blandingen efterfulgt af tilsætning af 6 enheder T4-DNA-ligase. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer.

5 Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den opnåede rekombinante plasmide blanding til opnåelse af en Ap^R-koloni. Et plasmid, pGVM101, vist på fig. 6, blev isoleret fra dyrkningsmediet for kolonien. Strukturen af pGVM101 blev bekræftet ved nedbrydningen med EcoRI, ClaI, HindIII og BamHI og agarose-
10 gelelektroforese. Det blev bekræftet ved metoden af Maxam-Gilbert, at basesekvensen fra HindIII-stedet til SinI-stedet i plasmidet pGVM101 er som følger.



15 Det humane IFN- γ -polypeptid, som pGVM101 koder for (derivatet kaldes i det følgende 3-Ser-IFN- γ) er klart forskelligt fra det kendte humane IFN- γ -polypeptid derved, at den tredje aminosyre (Cys) for modent humant IFN- γ er erstattet med Ser. Escherichia coli stamme bærende plasmid pGVM101 er blevet deponeret hos FERM som Escherichia coli IGVM101 (FERM BP-545).

EKSEMPEL 7

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

Escherichia coli HB101 stammer bærende rekombinante
5 plasmider pGVL10 og pGVM101, opnået i eksempel 5 - 6,
og pGWE4 (se DK patentansøgning nr. 1472/92), som kaldes
IGVL10, IGVM101 og IGWE4, blev dyrket ved 37 °C i 18
timer i LG-medium. 0,2 ml af dyrkningsmediet blev podet
i 10 ml MCG-medium, og dyrkning blev foretaget ved 30
10 °C i 4 timer. Derpå blev der tilsat 10 μ g/ml IAA, og
dyrkning blev fortsat i 4 timer. Dyrkningsmediet blev
centrifugeret ved 8000 omdr./min. i 10 minutter, og
de høstede celler blev vasket med en pufferopløsning
indeholdende 30 mM NaCl og 30 mM Tris-HCl (pH 7,5).
15 Vaskede celler blev suspenderet i 1 ml pufferopløsning
som beskrevet i det foregående, og 5 μ liter af en op-
løsning indeholdende 200 μ g lysozym og 0,25 M EDTA
blev tilsat. Blandingen blev centrifugeret i 30 minutter
til opnåelse af en overliggende væske. Mængden af inter-
20 feron i den overliggende væske blev bestemt efter metoden
af Armstrong, hvori Sindvis-virus blev anvendt som virus,
og FL-celler afledt fra humane amnionceller blev anvendt
som dyrecellerne. Resultaterne er vist i tabel 3.

TABEL 3

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

10 IGKA2 er en stamme, der bærer plasmid pGKA2, der koder for IFN- γ .

Referenceeksempel 1

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

15 I dette eksempel blev 6 μ g plasmid pIFN γ -G4 (3,6 Kb) opløst i 50 μ liter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 50 mM NaCl. Derpå blev 12 enheder af hvert af restriktionsenzymene PvuII og HindIII tilsat, og nedbrydningsreaktion blev udført ved 37 °C i 4 timer.

20 Reaktionsopløsningen blev opvarmet ved 65 °C i 7 minutter til inaktivering af enzymerne og underkastet rensning ved LGT-metoden til opnåelse af 1,2 μ g af et DNA-fragment på 1,3 Kb indeholdende human IFN- γ -DNA.

25 Separat blev 4 μ g pKYP-11 opløst i 40 μ liter (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 10 mM dithiothreitol og 50 mM NaCl. 8 enheder BamHI blev tilsat, og nedbrydningsreaktion

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

Derpå blev 0,5 µg af DNA-fragmentet på 1,3 Kb indeholdende human IFN-γ-DNA og 1,0 µg af DNA-fragmentet på ca. 4,7 Kb indeholdende P_{trp}, som blev opnået fra plasmidet pKYP-11, opløst i 20 µliter af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol og 500 µM ATP, og 4 enheder T4-DNA-ligase (produkt fra New England Biolabs) blev tilsat. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 18 timer, og Escherichia coli HB101 blev transformeret med den opnåede rekombinante plasmidblanding ved konventionel teknik til opnåelse af en Ap^R-koloni. Et plasmid, pGC-7, blev skilt fra dyrkningsmediet for kolonien. Strukturen af pGC-7 blev bekræftet ved nedbrydningen med HindIII, BamHI, HpaI, Sall, EcoRI og ClaI og agarosegelelektroforese. Escherichia coli stamme indeholdende pGC-7 er blevet deponeret hos FERM som Escherichia coli IGC-7 (FERM P-6814, FERM BP-497).

Referenceeksempel 2

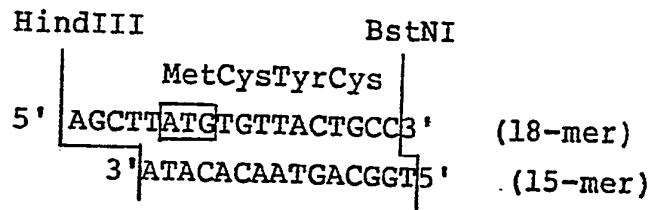
Konstruktion af rekombinant plasmid pGKA-2:

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

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

Den N-terminale aminosyre i det modne humane IFN- γ -polypeptid er Cys. For at udtrykke moden IFN- γ -DNA er det nødvendigt at tilvejebringe en initieringscodon (ATG) lige før den 5'-terminale codon TGT (Cys) og yderligere at indstille længden mellem SD-sekvens efter P_{trp} og ATG til en passende længde på 6 - 18 bp. Derfor synte-

tiseredes følgende DNA-linker.



To enkeltkædede DNAer af 18-mer og 15-mer blev syntetiseret ved en konventionel triestermetode [R. Crea, et al.: Proc. Natl. Acad. Sci., USA 75, 5765 (1978)]. Derpå blev 2 μ g af den 18-mer og 2 μ g af den 15-mer DNA opløst i 20 μ l (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol, 0,1 mM EDTA og 1 mM ATP. 30 enheder T4-polynucleotid-kinase (produkt fra Boehringer Mannheim GmbH) blev tilsat, og phosphoryleringsreaktion blev udført ved 37 °C i 60 minutter.

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

0,4 μ g af BstNI-SalI-fragmentet på 1125 bp opnået som i det foregående og afledt fra pGC-7 og 1,0 μ g af DNA-fragmentet på 4,1 kb opnået ved nedbrydning af udtrykkelsesvektoren pKYP-10 med HindIII og SalI blev opløst i 25 μ l (totalvolumen) af en opløsning indeholdende 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 6 mM MgCl₂, 5 mM dithiothreitol og 500 μ M ATP. Ca. 0,1 μ g af DNA-linkeren nævnt i det foregående blev sat til blandingen efterfulgt af tilsætning af 6 enheder T4-DNA-ligase. Ligeringsreaktion blev udført ved 4 °C i 17 timer. Escherichia coli HB101 blev transformeret under anvendelse af den opnåede rekombinante plasmide blanding ved konventionel

5 teknik til opnåelse af en Ap^R-koloni. Et plasmid, pGKA-2, som vist på fig. 5, blev isoleret fra dyrkningsmediet for kolonien. Strukturen af pGKA-2 blev bekræftet ved nedbrydning med EcoRI, ClaI, HindIII, BstNI og SalI og agarosegelelektroforese. Det blev bekræftet ved metoden af Maxam-Gilbert, at basesekvensen fra SD-sekvensen (AAGG) til initieringscodonen (ATG) i plasmidet pGKA-2 var "AAGGGTATCGATAAGCTTATG".

10 Escherichia coli stamme indeholdende pGKA-2 er blevet deponeret hos FERM som Escherichia coli IGKA-2 (FERM P-6798, FERM BP-496).

Aktivitetsforsøg

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

FORSØG 1

Aktivitet af interferon- γ i serum:

- 5 Aktiviteter af interferon- γ ifølge opfindelsen (herefter angivet som Gln⁹-IFN- γ) og den beskrevne i de modholdte publikationer (herefter angivet som Lys⁹-IFN- γ) i serum, blev undersøgt på følgende måde.
- 10 10 μ l af en opløsning indeholdende 100 μ g/ml IFN- γ (Gln⁹-IFN- γ eller Lys⁹-IFN- γ) og 490 μ l humant serum blev blandet og blandingen blev holdt ved 37 °C i 24 timer. Blandingen blev fortyndet 50 gange med MEM medium indeholdende 5% kvægserumalbumin, og IFN- γ -aktiviteten (antivirus-
- 15 aktivitet) blev bestemt ved metoden ifølge Armstrong (Armstrong J.A., et al.: Appl. Microbiol, 21, 723-725 (1971)). Som kontrol blev opløsningen indeholdende IFN- γ , holdt ved 4 °C i 24 timer og blev underkastet undersøgelser. Resultaterne er vist i efterfølgende tabel.

	<u>Gln⁹-IFN-γ</u>		<u>Lys⁹-IFN-γ</u>	
	Anti-		Anti-	
	virus-		virus-	
	akti-	Aktivi-	akti-	Aktivi-
25	vitet	tetsfor-	vitet	tetsfor-
	(U/ml)	hold	(U-ml)	hold
	Gennem-		Gennem-	
	snit		snit	
30	Kon-			
	trol	200,0	193,3	
		158,0	201,8	212,1
		149,9	241,2	1,00
		169,3		
		1,00		
35	Test	284,0	205,7	
		248,3	234,0	222,8
		230,9	228,8	1,05
		254,4		
		1,50		

FORSØG 2

Aktivering af IFN- γ ved behandling med trypsin:

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

15

20

25

30

35

	For- hold af tryp- sin: IFN- γ	<u>Gln⁹-IFN-γ</u>		<u>Lys⁹-IFN-γ</u>	
		Anti- virus- akti- vitet (U/ml) Gennem- snit	Aktivi- tetsfor- hold	Anti- virus- akti- vitet (U-ml) Gennem- snit	Aktivi- tetsfor- hold
10	Kon- trol	651,07 539,13 627,10	605,8 1,00	747,66 599,04 493,50	613,4 1,00
15	1:50	263,37 318,56 296,53	292,8 0,48	604,31 528,99 676,89	603,4 0,98
	1:100	1059,30 843,73 760,21	887,7 1,46	633,76 684,30 748,04	688,7 1,12
20	1:200	1404,19 1388,89 1184,88	1326,0 2,18	1271,8 1214,5 1235,6	1240,6 2,02
25	1:400	1708,70 1448,74 1501,81	1553,1 2,56	1004,08 1566,84 1356,62	1309,2 2,13

30

35

P a t e n t k r a v:

5 Derivat af humant interferon- γ -polypeptid, k e n d e -
t e g n e t ved, at det indkodes af et rekombinant plas-
mid valgt blandt pGVA-4, pGVK-13, pGVL-10 og pGVM-101,
som bæres af henholdsvis Escherichia coli FERM BP-395,
432, 544 og 545, og at polypeptidet er henholdsvis (Tyr-
10 3, Gln-9)- γ -IFN, (Ser-1,3, Gln-9)- γ -IFN, (Ser-1, Gln-9)-
 γ -IFN og (Ser-3, Gln-9)- γ -IFN.

15

20

25

30

35

Fig. 1

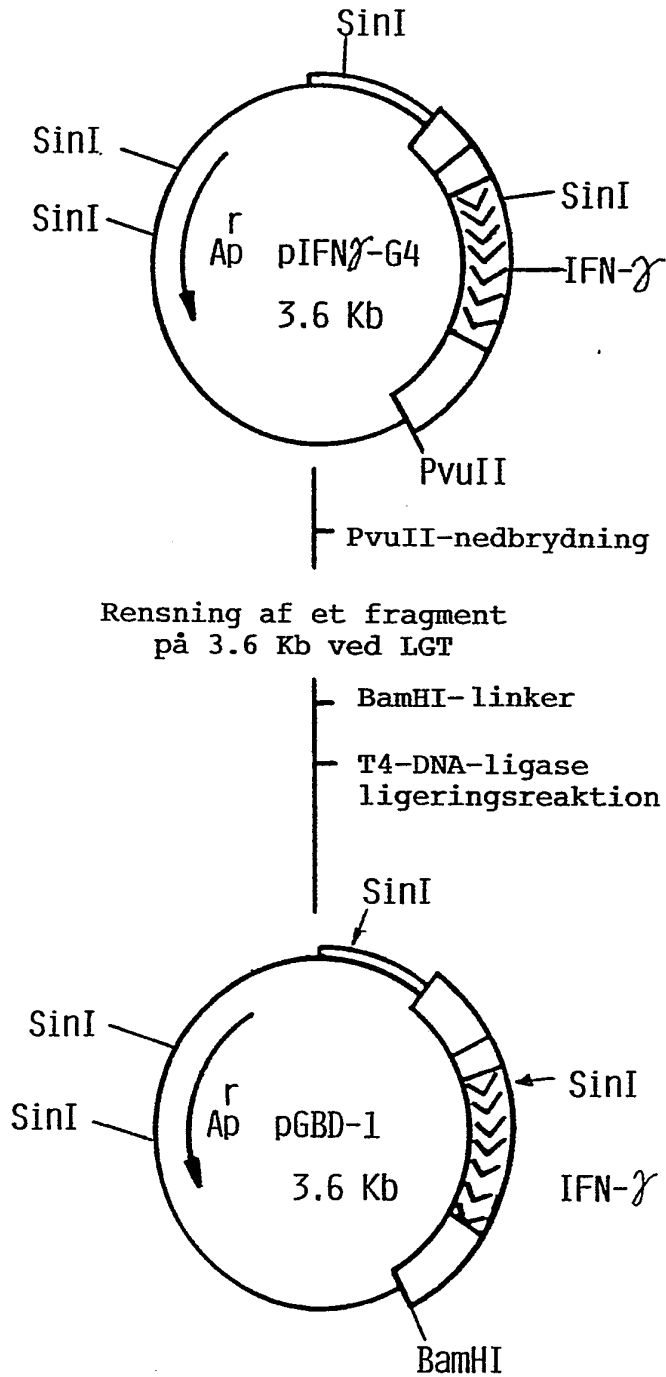


Fig.2

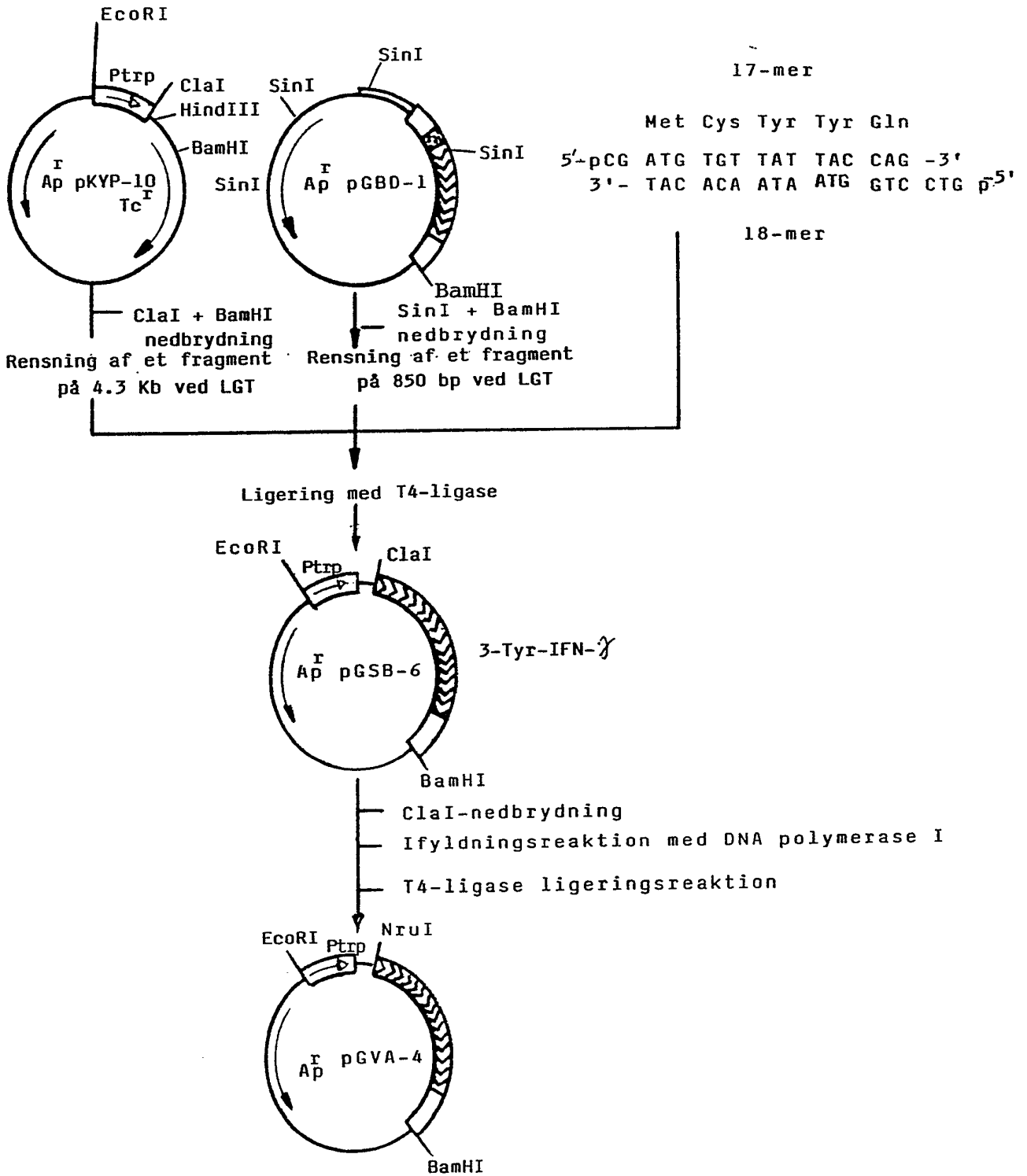


Fig.3

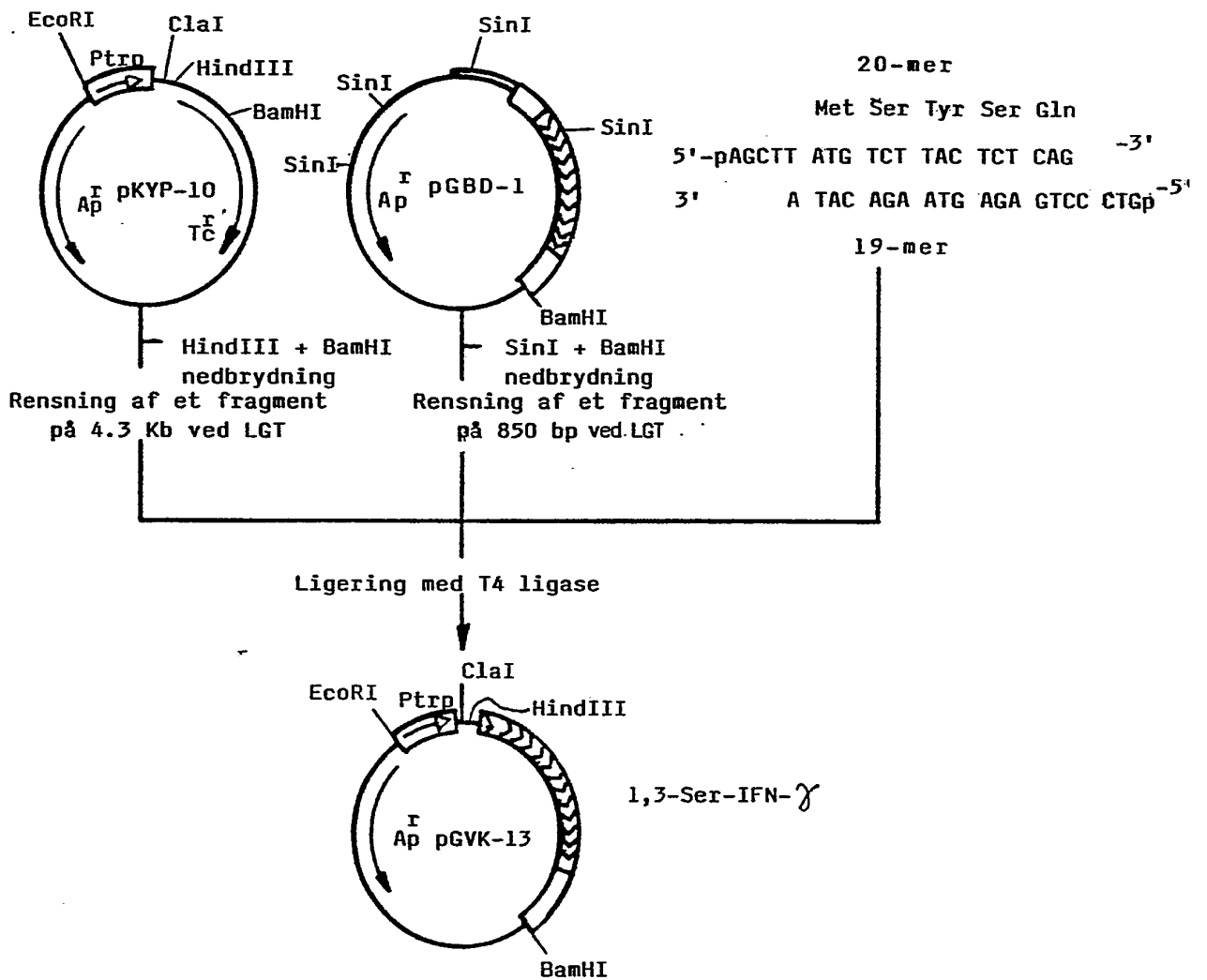


Fig. 4

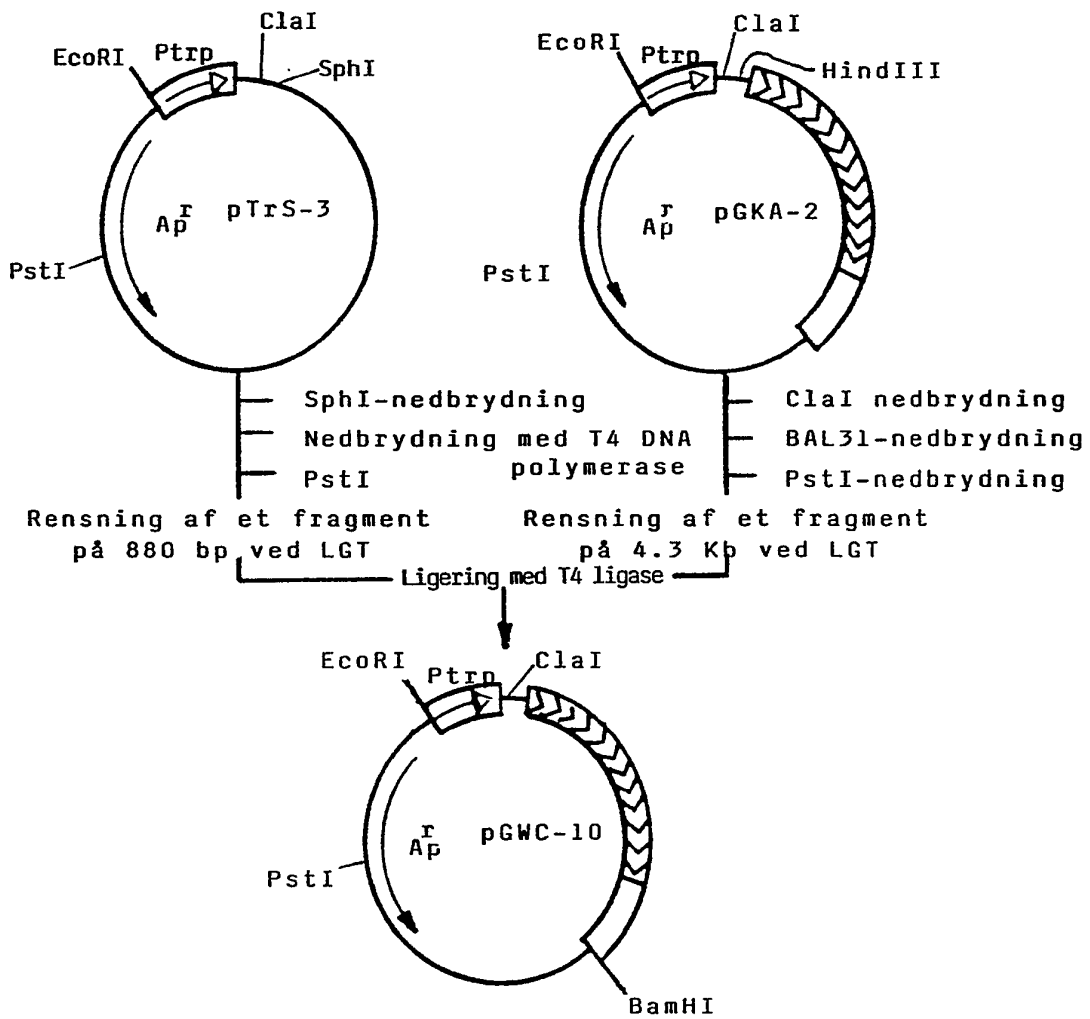


Fig.5

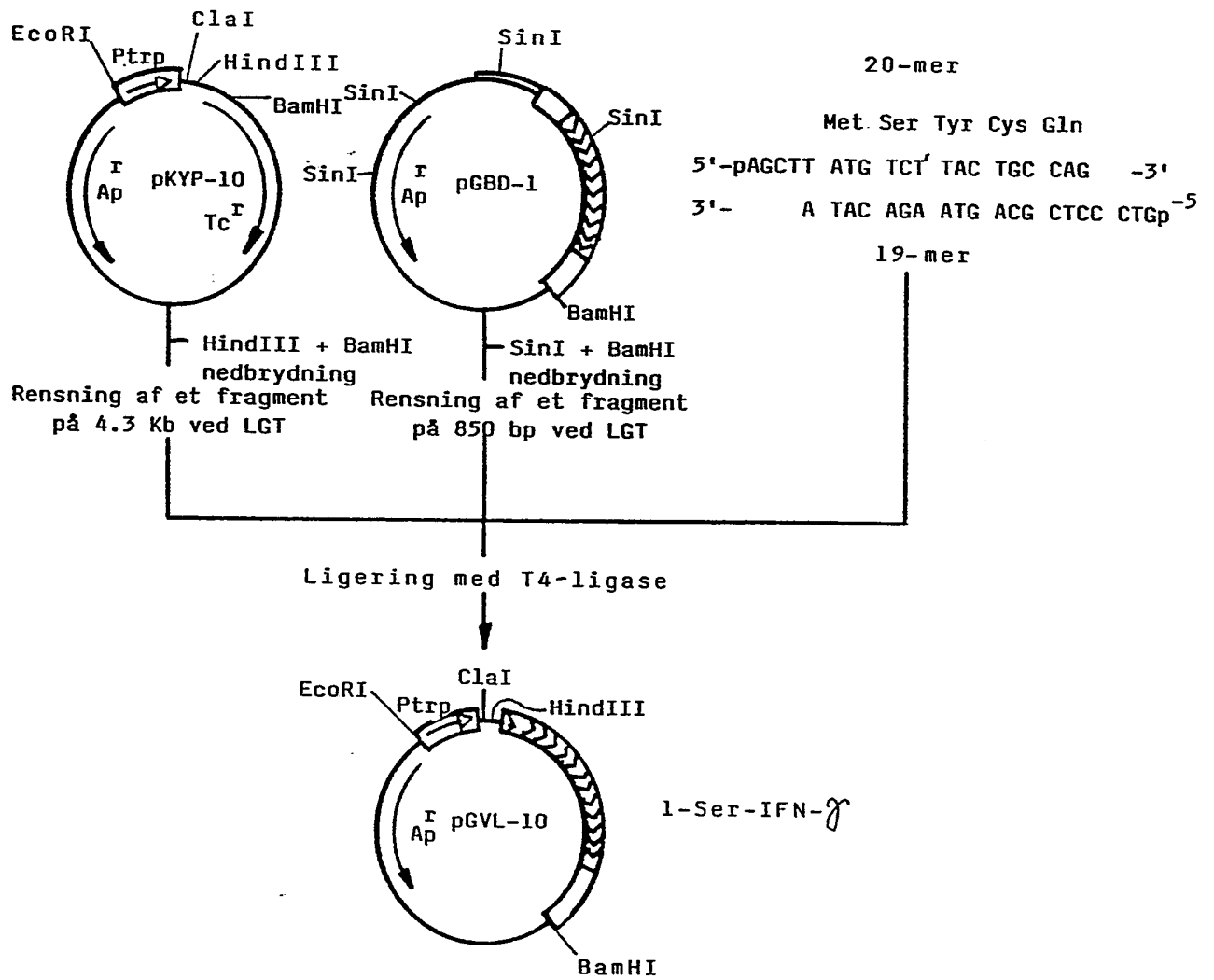


Fig.6

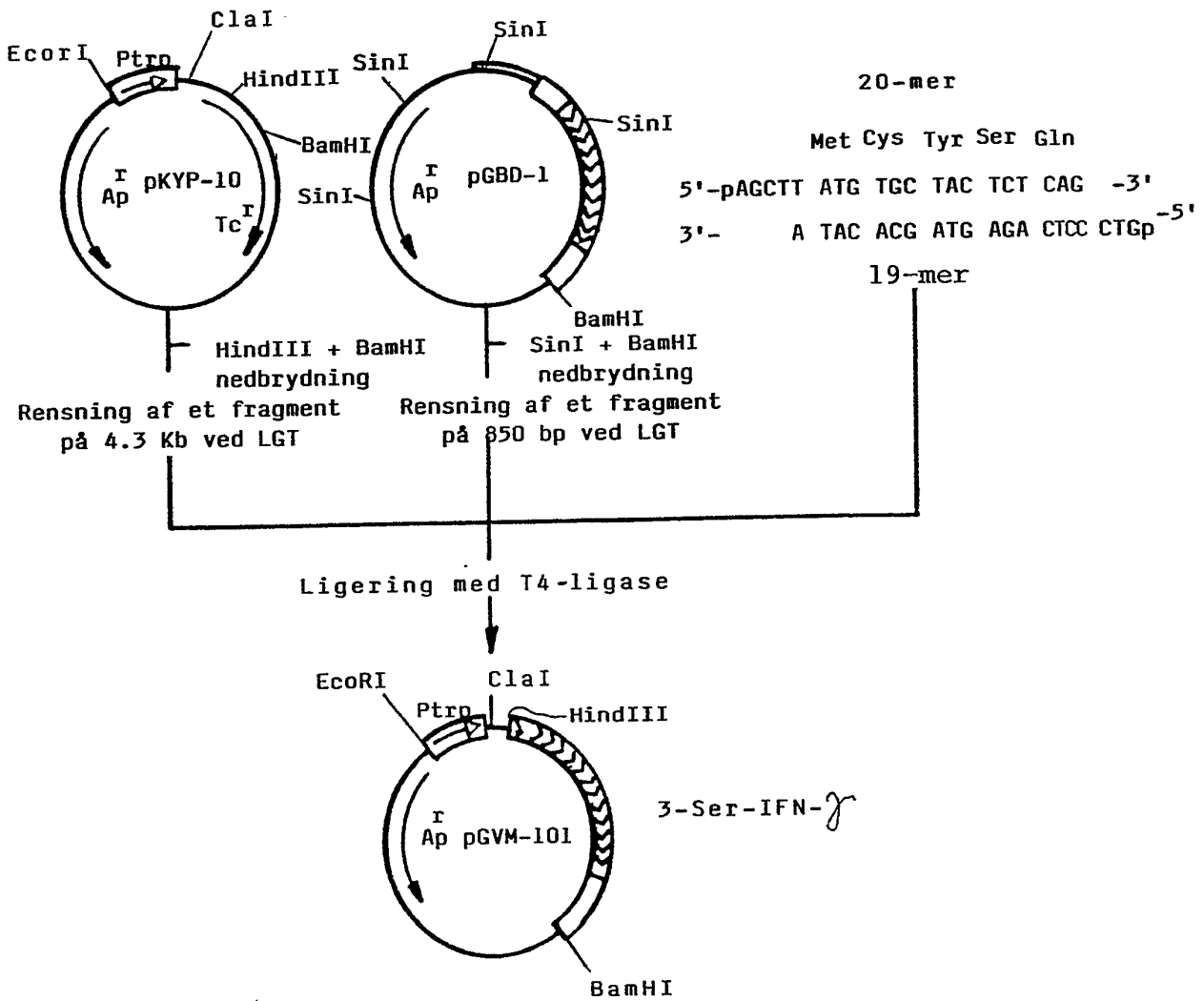


Fig.7

