

---

Octrooiraad



⑩ A **Terinzagelegging** ⑪ **8105078**

Nederland

⑲ NL

---

- ⑤4 **Hybride menselijke leukocyt-interferons.**
- ⑤1 Int.Cl<sup>3</sup>: C12N 15/00, A61K 45/02.
- ⑦1 Aanvrager: Genentech, Inc. te San Francisco, Californië, Ver. St. v. Am.
- ⑦4 Gem.: Ir. G.F. van der Beek c.s.  
NEDERLANDSCH OCTROOIBUREAU  
Joh. de Wittlaan 15  
2517 JR 's-Gravenhage.

- 
- ②1 Aanvraag Nr. 8105078.
- ②2 Ingediend 10 november 1981.
- ③2 Voorrang vanaf 10 november 1980, 23 februari 1981, 25 september 1981, 25 september 1981.
- ③3 Land van voorrang: Ver. St. v. Am. (US).
- ③1 Nummers van de voorrangsaanvragen: 205579 , 237388 , , 305657 .
- ⑥2 - -

- 
- ④3 Ter inzage gelegd 1 juni 1982.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

---

Hybride menselijke leukocyt-interferons.

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op de microbiële bereiding, via recombinant DNA-technologie, van hybride leukocyt-interferons voor toepassing bij de behandeling van virale en neoplastische ziekten en op de middelen en eindprodukten van een dergelijke  
5 bereiding.

Achtergrond van de uitvinding.

Relatief homogene leukocyt-interferons zijn afgeleid van leukocyten van normale of leukemische donors. Deze interferons zijn een groep van proteïnen, die gekenmerkt worden door een krachtig vermo-  
10 gen een tegen virus bestand zijnde toestand in huandoelcellen te verlenen. Bovendien kan interferon fungeren om celproliferatie te remmen en immuun reactie te regelen. Deze eigenschappen hebben het klinische gebruik van interferon als een therapeutisch middel voor de behandeling van virusinfekties en kwaadaardige ziekten ingegeven.

15 Meer recent is de recombinant DNA-technologie toegepast om de microbiële produktie van een aantal verschillende leukocyt-interferons, waarvan de aminozuurvolgorden de ordegröte van 70% homologie laten zien, de één betrekking hebbend op de ander, alle zoals beschreven door David V. Goeddel c.s. [Nature 290, (1981), 20-26] te  
20 veroorzaken. Genen, die de aminozuurvolgorden coderen van verschillende leukocyt-interferons onder andere aangeduid als respectievelijk LeIF A, B, C, D, F, G en H, worden verkregen uit de celreeks KG-1 beschreven door Koeffler, H.P. en Golde, D.W. [Science 200, (1978), 1153-1154] volgens David V. Goeddel en Sidney Pestka. De celreeks  
25 KG-1 is gedeponerd bij de "American type culture collection", ATCC toelatingsnummer CRL 8031. Dergelijke genen, op geschikte wijze ontplooid in plasmideachtige dragers voor bacteriële expressie, kunnen worden toegepast om gastheerbacteriën te transformeren, bij voorkeur E. coli K-12 stam 294, American type culture collection toelatings-  
30 nummer 31446, gedeponerd 28 oktober 1978.

Het werkpaard van de recombinant DNA-technologie is het plasmide, een non-chromosomale lus van dubbelstrengig DNA aangetroffen in bacteriën en andere microben, vaak in veelvoudige kopieën per cel. Op-  
genomen in de in het plasmide DNA gecodeerde informatie is die ver-  
35 eist om het plasmide in dochtercellen (dat wil zeggen een "replicon") en gewoonlijk, één of meer selectie-eigenschappen zoals, in het geval van bacteriën, resistentie tegen antibiotica, die het mogelijk maken klonen van de gastheercel, die het plasmide van interesse bevat-

8105078

ten en bij voorkeur te laten herkennen in selectieve media te  
groeien. De gebruiksmogelijkheden van plasmiden liggen in het  
feit, dat zij specifiek gesplitst worden door een of ander restric-  
tie-endonuclease of "restrictie-enzym", die elk een verschillende  
5 plaats op het plasmide-achtige DNA herkennen. Daarna kunnen hetero-  
loge genen of genfragmenten opgenomen worden in het plasmide door  
eindstandige vereniging bij de splitsingsplaats of bij geherstrukt-  
reerde einden, die grenzen aan de splitsingsplaats. DNA-recombinatie  
wordt buiten de cel uitgevoerd, maar het verkregen "recombinant"-  
10 plasmide kan erin worden ingevoerd volgens een werkwijze, bekend als  
transformatie en grote hoeveelheden van het verkregen heterologe gen  
bevattende recombinant-plasmide <sup>kunnen worden verkregen</sup> door de transformant te doen groeien.  
Bovendien kan, wanneer het gen op geschikte wijze is opgenomen onder  
verwijzing naar gedeelten van het plasmide, die de transcriptie en  
15 omzetting van de gecodeerde DNA-boodschap sturen, de verkregen ex-  
pressiedrager gebruikt worden om feitelijk de polypeptidevolgorde  
voort te brengen, waarvoor het opgenomen gen codeert, een werkwijze,  
die wordt aangeduid als expressie.

Expressie wordt geïnitieerd in een gebied bekend als de promo-  
20 tor, die herkend wordt door en gebonden wordt door RNA-polymerase.  
In sommige gevallen worden, zoals in de tryptofaan of "trp" promotor,  
die bij de uitvoering van de onderhavige uitvinding de voorkeur ver-  
dient, promotorgebieden overlapt door "operator"-gebieden onder vor-  
ming van een gecombineerde promotor-operator. Operators zijn DNA-  
25 volgorden, die herkend worden door zogenaamde repressorproteïnen,  
die dienen om de frequentie van transcriptie-initiëring bij een bij-  
zondere promotor te regelen. Het polymerase plant zich voort langs  
het DNA, onder overschrijving van de informatie, aanwezig in de code-  
ringsstreng van het 5'-einde ervan tot het 3'-einde ervan in bood-  
30 schapper RNA, die op zijn beurt vertaald wordt in een polypeptide  
met de aminozuurvolgorde, waarvoor het DNA codeert. Elk aminozuur  
wordt gecodeerd door een nucleotide triplet of "codon", waarbinnen  
voor de onderhavige doeleinden kan worden verwezen naar het "struk-  
turele gen", dat wil zeggen dat gedeelte, dat de aminozuurvolgorde  
35 van het geëxprimeerde produkt codeert. Na het binden aan de promotor  
schrijft het RNA-polymerase eerst nucleotiden over, die een ribosoom  
bindingsplaats coderen, vervolgens een vertalingsinitiëring of  
"start"-signaal (gewoonlijk ATG, dat in de resulterende boodschapper  
RNA AUG wordt), daarna de nucleotide codons binnen het structurele  
40 gen zelf. Zogenaamde stopcodons worden getranscribeerd bij het einde

8105078

van het structurele gen, waarna de polymerase een additionele volgorde van boodschapper RNA kan vormen, die, vanwege de aanwezigheid van het stopsignaal, door de ribosomen niet vertaald zal blijven. Ribosomen binden aan de bindingsplaats, die verschaft wordt op de  
5 boodschapper RNA, in bacteriën gewoonlijk naarmate het mRNA wordt gevormd, en brengen zelf het gecodeerde polypeptide voort, beginnende bij het vertalingsstartsignaal en eindigende bij het hiervoor vermelde stopsignaal. Het gewenste produkt wordt voortgebracht, wanneer de volgorden, die de ribosoom-bindingsplaats coderen, op geschikte wijze geplaatst zijn met betrekking tot het AUG initiatorcodon en wanneer alle overblijvende codons het initiatorcodon in fase volgen. Het resulterende produkt kan verkregen worden door de gastheer cel en het produkt door geschikte zuivering van ander bacterieel proteïne te winnen.

15 Korte samenvatting van de uitvinding.

Nucleotide volgorde-onderzoekingen van genen, die de verschillende leukocyt-interferons coderen, openbaren een gemeenschapsplaats onder verschillende ervan met betrekking tot de aanwezigheid en lokatie van splitsingsplaatsen, die herkend worden door bijzondere restrictie-endonucleasen. Volgens de onderhavige uitvinding kan van deze gemeenschappelijkheid voordeel worden getrokken voor het vormen, door DNA-recombinatie, van nieuwe hybride genen, die geschikt zijn bij de microbiële bereiding van hybride leukocyt-interferons, waarvan verwacht kan worden, dat deze in meerdere of mindere mate de  
25 tivirus en andere eigenschappen van interferons, gecodeerd door de oudergenen, bezitten. Bij voorkeurs-uitvoeringsvormen van de uitvinding kunnen dergelijke hybride leukocyt-interferons een verbeterde activiteit vertonen met betrekking tot die, die door de oudergenen zijn gecodeerd.

30 De ouder-leukocyt-interferongenen, die de hierin beoogde familie van leukocyt-interferonproteïnen coderen, vertonen van individu tot individu natuurlijke allelische variaties. Deze variaties kunnen gedemonstreerd worden bij een aminozuurverschil of aminozuurverschillen in de totale proteïnevolgorde of door doorhalingen, substituties,  
35 invoegingen, inversies of toevoegingen van een aminozuur of aminozuren in deze volgorde. Voor elk ouderleukocyt-interferon ervan, gemerkt LeIF A, LeIF B ... LeIF J, enz., zijn dergelijke allelische variaties opgenomen binnen het kader van het merkteken of de uitdrukking, die dit en derhalve de onderhavige uitvinding definiëren.

40

8105078

De wijze waarop deze en andere oogmerken en voordelen van de uitvinding worden verkregen, zal verder duidelijk worden uit de gedetailleerde beschrijving die volgt en uit de bijgevoegde figuren, waarin:

5 fig. 1 nucleotide volgorden van de coderingsgebieden van 8 leukocyt-interferon ("LeIF") complementaire DNA ("cDNA") klonen beschrijft. Hiervan is één, overeenkomstig aangeduid als LeIF E, een schijnbaar "pseudogen", dat geen actief leukocyt-interferon codeert, terwijl een ander, aangeduid als LeIF G minder dan de volledige  
10 volgorde voor de overeenkomstige interferonsoorten bevat. Het ATG vertaalbaar initiëeringscodon en het eindstandige triplet voor elke LeIF is onderstreept.

Fig. 2 stelt restrictie-endonucleasekaarten voor van acht typen LeIF gekloonde cDNA's (A tot en met H). Plasmiden, die de klonen be-  
15 vatten, werden geconstrueerd door de dC:dG staartmethode [Goeddel, D.V. c.s. Nature 287, (1980), 411 - 416]. Daarom kunnen de cDNA-inlassen weggenomen worden onder toepassing van Pst I, dat wil zeggen elk einde van elke inlas is een Pst I restrictie-endonucleasesplitsingsplaats. De lijnen aan het einde van elke cDNA-inlas stellen de  
20 flankerende homopolymere dC:dG-staarten voor. De plaatsen van Pvu II, Eco RI en Bgl II restrictieplaatsen zijn aangegeven. Beschaduwde gebieden van de figuur stellen de coderingsvolgorden voor van volwassen LeIF's; de kruislings gearceerde gebieden geven signaalpeptide-coderingsvolgorden aan en de open gebieden laten 3' en 5' noncode-  
25 rende volgorden zien.

Fig. 3 is een vergelijking van de acht LeIF proteïnevolgorden voorspeld uit de nucleotide volgorden. De éénletterige afkortingen aanbevolen door de IUPAC-IUB commissie over biologische nomenclatuur zijn gebruikt: A, alanine; C, cysteine; D, asparaginezuur; E, glutaminezuur; F, fenylalanine; G, glycine; H, histidine; I, isoleucine;  
30 K, lysine; L, leucine; M, methionine; N, asparagine; P, proline; Q, glutamine; R, arginine; S, serine; T, threonine; V, valine; W, tryptofaan en Y, tyrosine. De getallen verwijzen naar de aminozuurpositie (S verwijst naar signaalpeptide). Het streepje in de 165 amino-  
35 zuur LeIF A-volgorde bij positie 44 is ingevoerd om de LeIF A-volgorde in lijn te brengen met de 166 aminozuurvolgorden van de andere LeIF's. De LeIF E-volgorde werd bepaald door negering van het extra nucleotide (positie 187 van fig. 1) in het coderingsgebied ervan. De sterretjes wijzen op in-fase eindstandige codons. Aminozuren, die ge-  
40 meenschappelijk zijn voor alle LeIF's (met uitsluiting van het pseu-

8105078

dogen LeIF E) zijn eveneens aangegeven. De onderstreepte residuen zijn aminozuren, die eveneens aanwezig zijn in menselijk fibroblast-interferon.

Onder verwijzing naar fig. 1 corresponderen nucleotiden +1 tot 5 69 met S1 - S23 aminozuren van fig. 3. Codon TGT (nucleotiden 70 - 72) van fig. 1 komen overeen met cysteine (C, aminozuur 1) van fig. 3. In fig. 3 komt de Pvu II restrictie endonuclease splitsingsplaats voor tussen de codons voor aminozuren 92 en 93 in LeIF A, B, D, F en G, dat wil zeggen tussen nucleotiden 346 en 347 van fig. 1.

10 In fig. 4 worden de aminozuurvolgorden van volwassen leukocyt-interferons A en D vergeleken, een doorhaling van aminozuur 44 in LeIF A is daarbij aangegeven door streepjes. Alleen die LeIF D aminozuren, die verschillen van overeenkomstige aminozuren van LeIF A zijn voorgesteld: de aminozuurvolgorde van LeIF D is overigens iden-  
15 tiek met LeIF A. Fig. 4 geeft eveneens de relatieve positie aan op het overeenkomstige gen van Bgl II en Pvu II restrictie endonuclease splitsingsplaatsen, die worden toegepast bij de vorming van hybride leukocyt-genen van de uitvinding, die de voorkeur verdienen.

De fig. 5 en 6 lichten de resultaten toe van de vergelijkende  
20 beproeving van een hybride leukocyt-interferon van de uitvinding ("LeIF-A/D") op activiteit tegen encefalomyocarditis-virus ("EMC") en blaasachtige stomatitisvirus ("VSV"), respectievelijk in muiscellen.

De fig. 7 en 8 stellen de resultaten voor van vergelijkende  
25 proeven, met inbegrip van LeIF-A/D en andere interferons tegen EMC-virusinfekties bij respectievelijk muizen en hamsters. De gegevens in fig. 7 resulteren uit intraperitoneale behandelingen 3 uren voor de infectie. Doses van LeIF-A/D en LeIF-A worden getitreerd bij WISH-cellen.

Fig. 9 verschaft de DNA-volgorden van vijf LeIF-proteïnen hier-  
30 van, met inbegrip van de typen I en J.

#### Beschrijving van de voorkeurs-uitvoeringsvormen.

##### Toegepaste microorganismen.

Het beschreven werk hield het gebruik in van twee microorganis-  
men: E. coli x1776, zoals beschreven in het Amerikaanse octrooi-  
35 schrift 4.190.495 en E. coli K-12 stam 294 (einde A, thi<sup>-</sup>, hsr<sup>-</sup>, hsm<sup>+</sup><sub>k</sub>), zoals beschreven in het Britse octrooischrift 2.055.382. Elk is gedeponeerd bij de American Type Culture Collection, ATCC onthef-  
fing nummers 31537 en 31446, gedeponeerd 3 juli 1979 respectievelijk  
28 oktober 1978. Alle recombinant DNA-werk werd uitgevoerd overeen-  
40 komstig de toepasselijke richtlijnen van de National Institutes of

8105078

## Health.

De uitvoering wordt in de uitvoeringsvormen, die het meest de voorkeur verdienen, beschreven onder verwijzing naar E. coli, met inbegrip van niet alleen de stammen E. coli x 1776 en E. coli K-12 5 stam 294, zoals hiervoor gedefinieerd, maar ook andere bekende E. coli-stammen zoals E. coli B, of andere microbiële stammen, waarvan vele gedeponerd en (eventueel) verkrijgbaar zijn bij erkende micro-organisme deponeringsinstellingen, zoals the American Type Culture Collection, ATCC (zie de ATCC-kataloguslijst en eveneens het Duitse 10 Offenlegungsschrift 2.644.432). Tot deze andere microorganismen behoren bijvoorbeeld Bacilli, zoals Bacillus subtilis en andere enterobacteriaceae, waaronder als voorbeelden vermeld kunnen worden Salmonella typhimurium en Serratia marcesans, onder toepassing van plasmiden, die heterologe genvolgorden daarin kunnen repliceren en exprimeren. 15 Gist, zoals Saccharomyces cerevisiae, kan ook met voordeel worden toegepast als gastheerorganisme bij de bereiding van de interferonproteïnen hiervan door exprimeren van genencodering daarvoor onder de controle van een gistpromotor.

De LeIF-hybriden worden volgens de onderhavige uitvinding bereid door voordeel te trekken van restrictie endonuclease splitsings- 20 plaatsen, die gewoonlijk gelokaliseerd zijn binnen de individuele oudergenen en elk einde daarvan geconjugeerd met dezelfde plaatsen in dragerexpressieplasmiden (vectoren). Bijvoorbeeld kan het grote (~ 3900 bp) fragment van een Xba I tot Pst I ontsluiting van het 25 pLeIF A trp 25 expressieplasmide afgebonden worden met Xba I tot Pvu II en Pvu II tot Pst I ontsluitingsfragmenten van de verschillende LeIF-oudergenen voor het verschaffen van expressieplasmiden, die exploiteerbaar zijn voor het verkrijgen van het overeenkomstige hybride LeIF.

30 Elk LeIF-expressieplasmide werd onafhankelijk geconstrueerd met ontsluitingsfragmenten, geïsoleerd uit verschillende LeIF-plasmiden, bijvoorbeeld pLeIF A trp 25, pLeIF B trp 7, pLeIF C trp 35, pLeIF D trp 11, pLeIF F trp 1, pLeIF G, pLeIF H en pLeIF I, enz., waarvan de constructie beschreven is in Nature 287, 411 (1980) of uit pBR322, 35 waarvan de constructie beschreven is in Gene 2, 95 (1977). In bepaalde van deze plasmiden betekent "trp" een tryptofan-promotor - operatorsysteem, dat het meest de voorkeur verdient voor bacteriële expressie, zoals beschreven in de Europese octrooiaanvraag 36776. Direkte expressie van een eerste volledig ontwikkeld leukocyt-inter- 40 feron.

8105078

De gevolgde methode om Le-IF A direkt uit te drukken als een volledig ontwikkeld interferon-polypeptide hield de combinatie in van synthetische (N-eindstandig) en complementaire DNA's.

Een Sau 3a restrictie endonucleaseplaats is doelmatig gelokali-  
5 seerd tussen codons 1 en 2 van Le-IF A. Twee synthetische deoxyoligo-  
nucleotiden werden ontworpen, die een ATG vertaalbaar initiëringsco-  
don opnemen, het codon voor aminozuur 1 (cysteïne) herstellen en een  
Eco RI klevend einde voortbrengen. Deze oligomeren werden afgebonden  
tot een 34 b.p. Sau 3a - Ava II fragment van pL31. Het resulterende  
10 45 b.p. produkt werd afgebonden tot twee additionele DNA-fragmenten  
voor het construeren van een 865 basispaar synthetisch-natuurlijk  
hybride gen, dat codeert voor Le-IF A en dat gebonden is door Eco  
RI en Pst I restrictieplaatsen. Dit gen werd opgenomen in pBR322 tus-  
sen de Eco RI en Pst I-plaatsen voor het geven van het plasmide  
15 pLe-IF A1.

Plasmide pGM1 draagt het E. coli tryptofan operon, dat de door-  
haling ALB1413 [G.F. Miozzari c.s., J. Bacteriology 133, (1978),  
1457 - 1466] bevat en dientengevolge een fusieproteïne uitdrukt, dat  
de eerste 6 aminozuren van de trp-leider en ongeveer het laatste der-  
20 de van het trp E polypeptide (hierna aangeduid in conjunctie als  
LE'), alsmede het trp D polypeptide in zijn geheel bevat, alle onder  
de controle van het trp promotor-operatorsysteem. Het plasmide,  
20  $\mu$ g, werd ontsloten met het restrictie-enzym Pvu II, dat het plas-  
mide splitst op vijf plaatsen. De genfragmenten werden vervolgens ge-  
25 combineerd met EcoRI-verbindingsmiddelen (bestaande uit een zelf-  
complementair oligonucleotide van de volgorde: pCATGAATTCATG), waar-  
bij een EcoRI-splitsingsplaats verschaft wordt voor een latere kloon-  
vorming tot een plasmide, dat een EcoRI-plaats bevat. De 20  $\mu$ g van  
DNA-fragmenten verkregen uit pGM1, werden behandeld met 10 eenheden  
30  $T_4$  DNA-ligase bij aanwezigheid van 200 pico mol van het 5'-gefosfo-  
ryleerde synthetische oligonucleotide pCATGAATTCATG en in 20  $\mu$ l  $T_4$   
DNA ligasebuffer (20 mmol tris, pH 7,6, 0,5 mmol ATP, 10 mmol  $MgCl_2$ ,  
5 mmol dithiothreitol) bij 4°C gedurende de nacht. De oplossing werd  
vervolgens 10 minuten tot 70°C verwarmd om de afbinding te stoppen.  
35 De verbindingsmiddelen werden gesplitst door EcoRI-ontsluiting en de  
fragmenten, nu met EcoRI-einden werden gescheiden onder toepassing  
van 5% polyacrylamidegel-elektroforese (hierna "PAGE") en de drie  
grootste fragmenten werden uit de gel geïsoleerd door eerst te kleu-  
ren met ethidiumbromide, de fragmenten te lokaliseren met ultravio-  
40 let licht en uit de gel de van belang zijnde gedeelten te snijden.

8105078



Elk gelfragment, met 300 microliter 0,1xTBE, werd in een dialysezak geplaatst en onderworpen aan elektroforese bij 100 V gedurende één uur in 0,1xTBE buffer (TBE-buffer bevat: 10,8 g trisbase, 5,5 g boorzuur, 0,09 g Na<sub>2</sub>EDTA in 1 liter H<sub>2</sub>O). De water bevattende oplossing 5 werd uit de dialysezak verzameld, met fenol geëxtraheerd, met chloroform geëxtraheerd en 0,2 M natriumchloride gemaakt en het DNA werd in water teruggewonnen na precipitatie met ethanol. Het trp promotor-operator bevattende gen met EcoRI klevende einden werd geïdentificeerd bij de hierna beschreven procedure, die de opname omvat van 10 fragmenten in een voor tetracycline gevoelig plasmide, dat na promotor-operatoropname, tegen tetracycline bestand wordt.

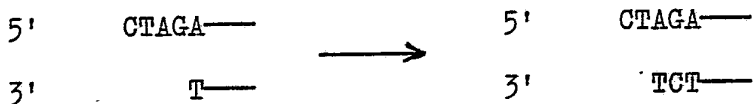
Plasmide pBRH1 (R.I. Rodriguez c.s., *Nucleic Acids Research* 6, [1979], 3267 - 3287) exprimeert ampicillineresistentie en bevat het gen voor tetracyclineresistentie maar exprimeert die resistentie 15 niet omdat er geen samenhangende promotor is. Het plasmide is dienvoltegevolge gevoelig voor tetracycline. Door invoering van een promotor-operatorstelsel in de EcoRI-plaats, kan het plasmide tegen tetracycline bestand worden gemaakt.

pBRH1 werd ontsloten met EcoRI en het enzym werd verwijderd 20 door extractie met fenol gevolgd door extractie met chloroform en werd in water gewonnen na precipitatie met ethanol. Het verkregen DNA-molecuul werd, in gescheiden reactiemengsels, gecombineerd met elk van de drie DNA-fragmenten zoals hiervoor verkregen en afgebonden met T<sub>4</sub> DNA ligase zoals hiervoor beschreven. Het in het reactie- 25 mengsel aanwezige DNA werd gebruikt om competente E. coli K-12 stam 294 (K. Backman c.s., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73, [1976], 4174 - 4198 volgens standaardtechnieken te transformeren (V. Hershfield c.s., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, [1974], 3455 - 3459) en de bacteriën als laag aan te brengen op LB-platen, die 20 µg/ml ampiciline en 5 µg/ml tetracycline bevatten. Verschillende tegen tetracycline bestand zijnde kolonies werden geselecteerd, plasmide DNA werd geïsoleerd en de aanwezigheid van het gewenste fragment werd bevestigd door restrictie-enzymanalyse. Het verkregen plasmide wordt aangeduid als pBRHtrp.

35 Een EcoRI en BamHI ontsluitingsproduct van het virale genom van hepatitis B werd verkregen volgens gebruikelijke methoden en tot kloonvorming gebracht in de EcoRI en BamHI plaatsen van plasmide pGHG (D.V. Goeddel c.s., *Nature* 281, [1979], 544) voor de vorming van het plasmide pHS32. Plasmide pHS32 werd gesplitst met XbaI, met 40 fenol geëxtraheerd, met chloroform geëxtraheerd en met ethanol ge-

8105078

precipiteerd. Het werd vervolgens behandeld met 1  $\mu$ l E. coli polymerase I, Klenow fragment (Boehringer-Mannheim) in 30  $\mu$ l polymerasebuffer (50 mmol kaliumfosfaat pH 7,4, 7 mmol  $MgCl_2$ , 1 mmol  $\beta$ -mercaptoëthanol), die 0,1 mmol dTTP en 0,1 mmol dCTP bevat gedurende 30 5 minuten bij 0°C en daarna 2 uren bij 37°C. Deze behandeling veroorzaakte dat twee van de vier nucleotiden complementair met het 5' uitstekende einde van de XbaI splitsingsplaats werden ingevuld:



10 Twee nucleotiden, dC en dT, werden opgenomen en gaven een einde met twee 5' uitstekende nucleotiden. Dit lineaire residu van plasmide pHS32 (na extractie met fenol en chloroform en winning in water na precipitatie met ethanol) werd gesplitst met EcoRI. Het grote plasmidefragment werd gescheiden van het kleinere EcoRI-XbaI fragment door PAGE en werd na elektro-elutie geïsoleerd. Dit DNA-fragment 15 van pHS32 (0,2  $\mu$ g), werd onder soortgelijke omstandigheden als die hiervoor beschreven gebonden aan het EcoRI-Taq I fragment van het tryptofan operon ( $\sim$ 0,01  $\mu$ g), afkomstig van pBRHtrp.

Bij de werkwijze van het verbinden van het fragment van pHS32 15 aan het EcoRI-Taq I fragment, zoals hiervoor beschreven, wordt het Taq I uitstekende einde verbonden met het XbaI overblijvende uitstekende einde, zelfs hoewel het niet volledig Watson-Crick basis gepaard is:



Een deel van dit verbindingsreactiemengsel werd getransformeerd in E. coli 294 cellen, met warmte behandeld en als laag aangebracht op LB-platen, die ampicilline bevatten. 24 Kolonies werden geselecteerd, werden in 3 ml LB media gekweekt en het plasmide werd afge- 25 scheiden. Bij zes ervan bleek de XbaI-plaats ontwikkeld te zijn via met E. coli gekatalyseerd DNA herstel en kopievorming:



Deze plasmiden bleken eveneens te splitsen met zowel EcoRI als 30 HpaI en de verwachte restrictiefragmenten te geven. Eén plasmide, aangeduid met pTrp 14 werd gebruikt voor expressie van heterologe polypeptiden, zoals hierna besproken.

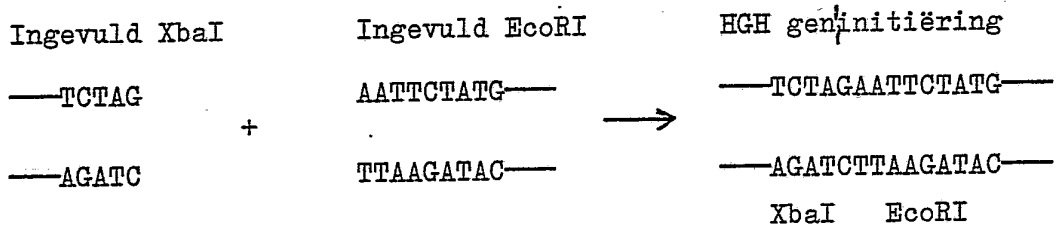
Het plasmide pHGH 107 (D.V. Goeddel c.s., Nature, 281, [1979], 544) bevat een gen voor menselijk groeihormoon samengesteld uit 23 aminozuurcodons voortgebracht uit synthetische DNA-fragmenten en 163 aminozuurcodons verkregen uit complementair DNA voortgebracht 5 via omgekeerde transcriptie van menselijke groeihormoonboodschapper RNA. Dit gen bevat, hoewel de codons van de "pre" volgorde van menselijk groeihormoon ontbreken, een ATG vertalingsinitiëringcodon. Het gen werd geïsoleerd uit 10 µg pHGH 107 na behandeling met EcoRI gevolgd door E. coli polymerase I Klenow fragment en dTTP en dATP 10 zoals hiervoor beschreven. Na extractie met fenol en chloroform en precipitatie met ethanol werd het plasmide behandeld met BamHI.

Het menselijk groeihormoon ("HGH") gen bevattende fragment werd geïsoleerd door PAGE gevolgd door elektro-elutie. Het resulterende DNA-fragment bevat ook de eerste 350 nucleotiden van het tegen tetra- 15 cycline bestand zijnde structurele gen, maar mist het tetracycline-promotor-operatorsysteem, zodat, wanneer vervolgens gekloond wordt tot een expressieplasmide, plasmiden, die de inlas bevatten, gelokaliseerd kunnen worden door het herstel van de bestandheid tegen tetracycline. Doordat het EcoRI-einde van het fragment is ingevuld 20 volgens de Klenow polymerase I methode, heeft het fragment één stomp en één klevend einde, dat een geschikte oriëntatie waarborgt bij latere opname in een expressieplasmide.

Het expressieplasmide pTrp14 werd vervolgens gereed gemaakt om het HGH-gen bevattende fragment, zoals hiervoor bereid, te ontvangen. 25 Derhalve werd pTrp14 met XbaI ontsloten en de verkregen klevende einden werden ingevuld met de Klenow polymerase I methode onder toepassing van dATP, dTTP, dGTP en dCTP. Na extractie met fenol en chloroform en precipitatie met ethanol werd het verkregen DNA behandeld met BamHI en het verkregen grote plasmidefragment werd geïsoleerd 30 door PAGE en elektro-elutie. Het van pTrp14 afgeleide fragment had één stomp en één klevend einde, wat de recombinatie in geschikte oriëntatie mogelijk maakt met het HGH-gen, dat het hiervoor beschreven fragment bevat.

Het HGH-genfragment en het pTrp14 ΔXba-BamHI-fragment werden 35 gecombineerd en tezamen verbonden onder omstandigheden, die soortgelijk zijn aan die hiervoor beschreven. De ingevulde XbaI en EcoRI-einden werden met elkaar verbonden door stomp eindeverbinding voor het herscheppen van zowel de XbaI als de EcoRIplaats:

8105078



Deze constructie herschept eveneens het gen met bestandheid tegen  
5 gen tetracycline. Aangezien het plasmide pHG 107 bestandheid tegen  
tetracycline exprimeert uit een promotor, die stroomopwaarts ligt  
van het HGH-gen (de lac-promotor), maakt deze constructie, aangeduid  
met pHG 207, exprimering mogelijk van het gen voor bestandheid tegen  
10 tetracycline onder de controle van de tryptofan-promotor-opera-  
tor. Derhalve werd het afbindingsmengsel getransformeerd in E. coli  
294 en werden kolonies geselecteerd op LB-platen, die 5 µg/ml tetra-  
cycline bevatten.

Plasmide pHG207 werd met EcoRI ontsloten en de trp-promotor,  
die een 300 b.p. EcoRI-fragment bevatte, werd gewonnen door PAGE ge-  
15 volgd door elektro-elutie. Het 300 b.p. EcoRI-fragment bevat de  
E. coli trp-promotor, operator en trp leider ribosoom-bindingsplaats,  
maar mist een ATG-volgorde voor de vertalingsinitiëring. Dit DNA-  
fragment werd gekloond in de EcoRI-plaats van pLe-IF A.

Het zo juist aangehaalde trp-fragment is een analoog van het  
20 E. coli tryptofan-operon, waaruit de zogenaamde trp-verdunner is  
doorgehaald om de expressieniveau's op regelbare wijze te verhogen.  
Expressieplasmiden, die het gemodificeerde trp-regulon bevatten,  
kunnen gekweekt worden tot vooraf bepaalde niveau's in voedingsmedia,  
die extra tryptofan bevatten in voldoende hoeveelheden om het promo-  
25 tor-operatorsysteem te onderdrukken, daarna worden beroofd van tryp-  
tofan, om de onderdrukking van het systeem op te heffen en de ex-  
pressie van het beoogde produkt te doen plaats hebben.

Meer in het bijzonder werden 250 µg plasmide pL31 ontsloten  
met Pst I en de 1000 b.p. inlas werd geïsoleerd door gelelektrofore-  
30 se op een 6 polyacrylamidegel. Ongeveer 40 µg inlas werden geëlek-  
troëlueerd uit de gel en verdeeld tot 3 evenmatige hoeveelheden voor  
verdere ontsluiting: a) een monster van 16 µg van dit fragment werd  
ten dele ontsloten met 40 eenheden Bgl II gedurende 45 minuten bij  
37°C en het reactiemengsel werd gezuiverd op een 6 polyacrylamidegel.  
35 Ongeveer 2 µg van het gewenste 670 b.p. fragment werden gewonnen.  
b) Een ander monster (8 µg) van de 1000 b.p. Pst I inlas werden be-  
perkt met Ava II en Bgl II. Eén µg van het aangegeven 150 b.p. frag-  
ment werd gewonnen na gelelektroforese. c) 16 µg van het 1000 b.p.

8105078

stuk werden behandeld met Sau 3a en Ava II. Na elektroforese op een 10 polyacrylamidegel werd ongeveer 0,25  $\mu\text{g}$  ( $\sim 10$  pmol) van het 34 b.p. fragment gewonnen. De twee aangegeven deoxyoligonucleotiden, 6'-dAATTCATGTGT (fragment 1) en 5'-d GATCACACATG (fragment 2) werden 5 bereid volgens de fosfotriëstermethode (Maxam en Gilbert, Methods Enzymol. 65, [1980], 499 - 560). Fragment 2 werd als volgt gefosforyleerd. 200  $\mu\text{l}$  ( $\sim 40$  pmol) ( $\gamma^{32}\text{P}$ ) ATP (Amersham, 5000 Ci/mmol) werden gedroogd en opnieuw gesuspendeerd in 30  $\mu\text{l}$  60 mmol Tris-HCl (pH 8), 10 mmol  $\text{MgCl}_2$ , 15 mmol  $\beta$ -mercaptoëthanol, die 100 pmol DNA- 10 fragment en 2 eenheden T4 polynucleotide kinase bevatten. Na 15 minuten bij  $37^\circ\text{C}$  werd 1  $\mu\text{l}$  10 mmol ATP toegevoegd en werd de reactie nog eens 15 minuten voortgezet. Het mengsel werd vervolgens 15 minuten tot  $70^\circ\text{C}$  verwarmd, gecombineerd met 100 pmol 5'-OH fragment 1 en 10 pmol van het 34 b.p. Sau 3a - Ava II fragment. Verbinding werd 15 gedurende 5 uren uitgevoerd bij  $4^\circ\text{C}$  in 50  $\mu\text{l}$  20 mmol Tris-HCl (pH 7,5) 10 mmol  $\text{MgCl}_2$ , 10 mmol dithiotreitol, 0,5 mmol ATP en 10 eenheden T4 DNA ligase. Het mengsel werd aan elektroforese onderworpen op een 6 polyacrylamidegel en het 45 b.p. produkt werd door elektro- 20 elutie gewonnen. 860.000 Cerenkov cpm werden gewonnen ( $\sim 30$  ng, 1 pmol), werden gecombineerd met 0,5  $\mu\text{g}$  (5 pmol) 150 b.p. Ava II - Bgl II fragment en 1  $\mu\text{g}$  (2 pmol) 670 b.p. Bgl II - Pst I fragment. De verbinding werd bij  $20^\circ\text{C}$  gedurende 16 uren uitgevoerd onder toepassing van 20 eenheden T4 DNA ligase. De ligase werd geïnactiveerd door 10 minuten te verwarmen tot  $65^\circ\text{C}$ . Het mengsel werd vervolgens 25 ontsloten met Eco RI en Pst I om polymeren van het gen te elimineren. Het mengsel werd gezuiverd door 6% polyacrylamidegel-elektroforese. 360.000 cpm ( $\sim 0,04$  pmol, 20 ng) 865 b.p. produkt werden geïsoleerd. De helft hiervan (10 ng) werd gebonden in pBR322 (0,3  $\mu\text{g}$ ) tussen de EcoRI en Pst I plaatsen. Transformatie van E. coli 294 gaf 30 70 tegen tetracycline bestand zijnde, voor ampicilline gevoelige transformanten. Plasmide DNA geïsoleerd uit 18 van deze transformanten werd ontsloten met EcoRI en Pst I. 16 Van de 18 plasmiden hadden een EcoRI -Pst I fragment 865 b.p. in lengte. Eén  $\mu\text{g}$  van één daarvan, pLe-IF A1, werd ontsloten <sup>met</sup> EcoRI en verbonden aan 300 b.p. 35 EcoRI fragment (0,1  $\mu\text{g}$ ), dat de E. coli trp-promotor en trp-leider ribosoom bindingsplaats bevatte, bereid zoals hiervoor beschreven. Transformanten, die de trp-promotor bevatten, werden geïdentificeerd onder toepassing van een  $^{32}\text{P}$ -trp-monster in samenhang met de Grunstein-Hogness kolonie zeefprocedure--Grunstein c.s. [Proc. Natl. 40 Acad. Sci. (USA) 72, (1975), 3961]. Een asymmetrisch gelocaliseerde

8105078

Xba I plaats in het trp-fragment maakte de bepaling van recombinanten mogelijk, waarin de trp-promotor georiënteerd was in de richting van het Le-IF A gen.

5 Extrakten voor IF-bepaling werden als volgt bereid. Kultures van 1 ml werden gekweekt in L vloeistof die 5 µg/ml tetracycline bevatte, tot een  $A_{550}$  van ongeveer 1,0 en werden vervolgens verdund in 25 ml M9 media, die 5 µg/ml tetracycline bevatten. Monsters van 10 ml werden verzameld door centrifugeren wanneer  $A_{550}$  1,0 bereikte en celkorrels werden gesuspendeerd in 1 ml 15% sucrose, 50 mmol Tris-HCl (pH 8,0), 50 mmol EDTA. Eén mg lysozyme werd toegevoegd en na 5 minuten bij 0°C werden cellen gebroken door geluidsgolven. De monsters werden 10 minuten bij 15.000 omwentelingen per minuut gecentrifugeerd in een Sorvall SM-24 rotor. De interferon-activiteit in de bovenstaande vloeistoffen werd bepaald door vergelijking met 15 Le-IF normen door de remmingsproef voor het cytopatische effect (CPE). Voor het bepalen van het aantal IF-moleculen per cel werd een Le-IF specifieke activiteit van  $4 \times 10^8$  eenheden/mg gebruikt [Rubinstein c.s., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, (1979), 640].

Kloon pLe-IF A trp 25, waarin de trp-promotor was opgenomen in 20 de gewenste oriëntatie, geeft hoge activiteitsniveau's (zoals  $2,5 \times 10^8$  eenheden per liter). Het IF, geproduceerd door E. coli K-12 stam 294/pLe-IF A trp 25 gedraagt zich als authentiek menselijk Le-IF; het is stabiel ten opzichte van een behandeling bij een pH van 2 en wordt geneutraliseerd door konijnen anti-menselijk leukocyt antilichamen. Het interferon heeft een schijnbaar molecuulgewicht van ongeveer 20.000.

#### Isolatie van cDNA's voor additionele leukocyt-interferons.

DNA van het volledig gekenmerkte Le-IF A cDNA bevattende plasmide werd weggenomen met Pst I, werd elektroforetisch geïsoleerd en 30 werd volgens een gepubliceerde methode [Taylor c.s., Biochem. Biophys. Acta. 442, (1976), 324 met  $^{32}\text{P}$  gemerkt. Het verkregen radio-actief gemerkte DNA werd gebruikt als een monster om additionele E. coli 294 transformanten te zeven volgens een in situ koloniezeeffmethode, Grunstein c.s., zie hiervoor. Kolonies werden geïso- 35 leerd, die hybridiseerden in verschillende hoeveelheden ten opzichte van het monster. Plasmide DNA uit deze kolonies en de tien hiervoor gehybridiseerde kolonies werden geïsoleerd door Pst-snijding en werden gekenmerkt door drie verschillende methoden. Eerst werden deze Pst-fragmenten gekenmerkt door hun restrictie endonuclease-ontsluitingspatronen met de enzymen Bgl II, Pvu II en EcoRI. Deze analyse 40

8105078

maakte de klassificatie mogelijk van ten minste acht verschillende typen (Le-IF A, Le-IF B, Le-IF C, Le-IF D, Le-IF E, Le-IF F, Le-IF G en Le-IF H), die de lokatie van verschillende restrictie-afsnijdingen benaderen in verband met de nu bekende voorvolgorde en code-5 ringsvolgorde van Le-IF A. Eén daarvan, Le-IF D, wordt verondersteld identiek te zijn met die vermeld door Nagata c.s., Nature 284, (1980), 316.

In de tweede plaats werden bepaalde van de DNA's beproefd volgens een gepubliceerde hybridiseringsselectieproef, Cleveland c.s., Cell 20, (1980), 95, op het vermogen selectief Le-IF mRNA uit poly-A bevattend KG-1 cel RNA te verwijderen. Le-IF A, B, C en F waren bij deze bepaling positief. In de derde plaats werden de laatste Pst-fragmenten opgenomen in een expressieplasmide. E. coli 294 werd getransformeerd met het plasmide en de fragmenten werden geëxprimeerd. De expressieproducten, waarvan verondersteld wordt dat zij pre-interferons waren, waren alle positief volgens de CPE-bepaling op interferonactiviteit, zij het marginaal actief in het geval van het Le-IF-F-fragment. Naast het voorgaande waren alle beschreven Le-IF-typen in sekwentie gebracht.

20 Tweede volledig ontwikkeld leukocyt-interferon.

De volgorde van het geïsoleerde fragment, dat het gen voor volledig ontwikkeld Le-IF-B bevat, laat zien, dat de eerste veertien nucleotiden van de typen A en B identiek zijn. Wij stelden dienovereenkomstig voor een fragment te isoleren uit pLe-IF A25, dat de trp-25 promotor-operator, ribosoom bindingsplaats en het begin van het Le-IF (A=B) gen draagt, en dit te combineren met het resterende deel van de B-volgorde in een expressieplasmide.

Voor het verkrijgen van het benaderde 950 b.p. Sau 3a aan Pst I fragment uit de volgorde, zoals aangegeven in fig. 7a, waren verschillende trappen noodzakelijk vanwege de aanwezigheid van één of meer interveniërende Sau 3a restrictieplaatsen, dat wil zeggen:

1. De volgende fragmenten werden geïsoleerd:

a) 110b b.p. uit Sau 3a aan EcoRI;

b) 132 b.p. uit EcoRI aan Xba;

35 c) >700 b.p. uit Xba aan Pst.

2. Fragmenten (1a) en (1b) werden verbonden en gesneden met Xba en Bgl II om zelf-polymerisatie uit te sluiten door Sau 3a en Xba eindstandige groepen (de relevante Sau 3a-plaats was binnen een Bgl II-plaats; Bgl II snijdt en laat een Sau 3a klevend einde achter).

40 Een 242 b.p.-fragment werd geïsoleerd.

8105078

3. Het produkt van (2) en (1c) werd verbonden en gesneden met Pst I en Bgl II, opnieuw om zelf-polymerisatie te voorkomen. Een benaderd 950 b.p.-fragment, Sau 3a aan Pst I van fig. 7a werd geïsoleerd. Dit fragment bevatte dat gedeelte van het Le-IF B-gen, dat 5 niet gemeenschappelijk was met Le-IF A.

4. Een benaderd 300 b.p.-fragment (Hind III aan Sau 3a), dat de trp promotor-operator, de ribosoom bindingsplaats, het ATG-startsignaal en het cysteïncodon van Le-IF A bevatte, werd geïsoleerd uit pLe-IF A25.

10 5. Een benaderd 3600 b.p.-fragment Pst I aan Hind III werd geïsoleerd uit pBr 322. Dit bevatte het replicon en gecodeerd tetracycline, maar geen bestandheid tegen ampicilline.

6. De fragmenten verkregen bij de trappen 3, 4 en 5 werden drievoudig verbonden en het verkregen plasmide werd getransformeerd 15 in *E. coli* K-12 stam 294.

Transformanten werden aan een minizeefbehandeling onderworpen, Birnboim c.s., *Nucleic Acid Research* 7, (1979), 1513 en plasmidemonsters werden ontsloten met EcoRI. Ontsluitingen gaven drie fragmenten kenmerkend voor:

20 1) Het Eco RI-Eco RI trp-promotorfragment; 2) het inwendige EcoRI aan EcoRI-fragment van pL4 en 3) proteïne verlatend startsignaal aan EcoRI-fragment van pL4.

Bij de CPE-bepaling leveren bacteriële extracten uit klonen, bereid op de voorafgaande wijze, gewoonlijk  $10 \times 10^6$  eenheden interferon activeert per liter op bij  $A_{550}=1$ . Een op deze wijze bereide 25 kloon is 294/pLIF B trp 7.

Andere volledig ontwikkelde leukocyt-interferons.

Additionele genfragmenten van volle lengte, die andere Le-IF-typen bevatten, kunnen pasklaar gemaakt worden en geplaatst worden 30 in expressiedragers voor expressie zoals in het geval van Le-IF A. Volledige volgordevorming volgens gebruikelijke methoden zal onthullen of een restrictieplaats voldoende dicht bij het eerste aminozuureodon van het volledig ontwikkelde interferontype ligt om een doelmatige toevloed mogelijk te maken voor de toegang onder toepassing 35 van de eliminatie van de voorvolgorde door restrictiesnijding en vervanging van codons voor de N-eindstandige aminogroepen, die verloren gaan bij de voorvolgorde-eliminering door verbinding van een synthetisch DNA-fragment, zoals hiervoor beschreven. Ontbreekt dat, dan kan de methode beschreven in Kleid c.s., zie hiervoor, worden toege- 40 past. In het kort omvat dit splitsing van het voorvolgorde bevatten-



de fragment juist voor het punt, waarbij het codon voor het eerste aminozuur van het volledig ontwikkelde polypeptide begint, door:

1. omzetting van het dubbelstrengige DNA tot een enkelstrengig DNA in een gebied, dat dat punt omgeeft;
- 5 2. hybridisering aan het enkelstrengige gebied gevormd bij trap (a) van een complementaire inleiderlengte van een enkelstrengig DNA, waarvan het 5'-einde van de inleider tegenover het nucleotide ligt, dat grenst aan de beoogde splitsingsplaats;
3. herstel van dat deel van de tweede streng, geëlimineerd bij 10 trap 1, die in de 3'-richting ligt van de inleider door reactie met DNA-polymerase bij aanwezigheid van adenine, thymine, guanine en cytosine bevattende deoxynucleotide-trifosfaten; en
4. ontsluiting van de resterende enkelstrengige lengte van DNA, die uitsteekt buiten het beoogde splitsingspunt.

15 Een korte lengte van synthetisch DNA, dat eindigt, bij het 3'-einde van de coderingsstreng, met het vertalingsstartsignaal ATG, kan vervolgens verbonden worden door, bijvoorbeeld stompeindige verbinding aan het verkregen pasklaar gemaakte gen voor de volledig ontwikkelde interferons en het gen kan opgenomen worden in een ex- 20 pressieplasmide en onder de controle worden gebracht van een promotor en de daarmee samenhangende ribosoom bindingsplaats.

Op een soortgelijke wijze als hiervoor toegepast werden genfragmenten, die Le-IF-C en Le-IF-D coderen, op geschikte wijze ge- 25 configureerd voor directe bacteriële expressie. De expressiestrategie voor deze additionele leukocyt-interferons omvat, in elk geval, het begeven naar het benaderde 300 b.p.-fragment (Hind III aan Sau 3a), dat de trp promotor-operator, ribosoom bindingsplaats, ATG-startsignaal en cysteïncodon van Le-IF A uit pLe-IF A25 bevat. Hier- 30 aan werden genfragmenten gecombineerd uit de additionele interferongenen, die hun respectievelijke aminozuurvolgorden buiten het initiële cysteïne, dat voor alle gemeenschappelijk is, coderen. Elk resulterend plasmide werd gebruikt om E. coli K-12 stam 294 te transformeren. Verbindingen om de respectievelijke genen te vormen waren als volgt:

35

Le IF-C

Isoleer de volgende fragmenten uit pLe IF-C:

- (a) 35 b.p. uit Sau 3a aan Sau 96.
- (b) >900 b.p. Sau 96 aan Pst I.
- (c) Isoleer een benaderd 300 b.p.-fragment (Hind III - Sau 3a) uit 40 pLe IF A-25 zoals in deel N (4) hiervoor.

8105078

(d) Isoleer het benaderde 3600 b.p.-fragment uit deel N (5) hiervoor.

Constructie:

(1) Verbindt (a) en (c). Splits met Bgl II, Hind III en isoleer het benaderde 335 b.p.-produkt.

5 (2) Verbindt drievoudig (1) + (b) + (d) en transformeer E. coli met het resulterende plasmide.

Een representatieve kloon, die op deze wijze is gemaakt, is E. coli K-12 stam 294/pLe IF C trp 35.

Le-IF D

10 Isoleer uit pLe IF-D:

a) 35 b.p. uit Sau 3a aan Ava II.

b) 150 b.p. uit Ava II aan Bgl II.

c) Benaderd 700 b.p. uit Bgl II aan Pst I.

Isoleer uit pLe IF A25:

15 d) 300 b.p. uit Hind III aan Sau 3a.

Isoleer uit PBr 322:

e) benaderd 3600 b.p. uit Hind III aan Pst I.

Constructie.

(1) Verbindt (a) + (b), snij met Bgl II en zuiver een 185 b.p.-  
20 produkt (1).

(2) Verbindt (1) + (d), snij met Hind III, Bgl II en zuiver het benaderde 500 b.p.-produkt (2).

(3) Verbindt (2) + (c) + (e) en transformeer E. coli met het resulterende plasmide.

25 Een representatieve kloon, die op deze wijze is bereid, is E. coli K-12 stam 294/pLeIF D trp 11.

Le-IF F

Het Le-IF F bevattende fragment kan pasklaar worden gemaakt voor direkte expressie door herverzameling geschikt gemaakt door de  
30 volledige homologie van aminozuren 1-13 van Le-IF B en Le-IF F. Een trp promotor bevattend fragment (a) met geschikt geconfigureerde einden wordt verkregen uit hiervoor beschreven pGH 207 via Pst I en Xba I ontsluiting gevolgd door isolering van het benaderde 1050 b.p.-  
35 de fragmenten resulterend uit Pst I en Bgl II ontsluiting van het plasmide pHKY 10, een derivaat van pBR322, dat een Bgl II-plaats bevat tussen de tetracycline resistentiepromotor en het structurele gen. Fragment (a) bevat ongeveer de helft van de gen coderende ampicillineresistentie; fragment (b) bevat de rest van dat gen en het  
40 totale gen voor tetracycline-resistentie behalve de geassocieerde

8105078

promotor. Fragmenten (a) en (b) worden gecombineerd via T4 ligase en het produkt wordt behandeld met Xba I en Bgl II om dimerisatie te elimineren, onder vorming van een fragment (c), dat de trp promotor-operator en genen voor tetracycline en ampicilline resistentie bevat.

Een fragment (d) van ongeveer 580 b.p. wordt verkregen door Ava II en Bgl II ontsluiting van pLe IF-F. Dit bevat codons voor aminozuren 14-166 van Le-IF F.

Een fragment (e) (49 b.p.) wordt verkregen door Sba I en Ava II ontsluiting van pLe-IF B. Fragment (e) codeert aminozuren 1-13 van Le-IF F.

Fragmenten (c), (d) en (e) zijn drievoudig verbonden bij de aanwezigheid van T4 ligase. De cohesieve einden van de respectievelijke fragmenten zijn zodanig, dat de plasmidesamenstelling juist circuleert, waarbij het tetracycline resistentiegen onder de controle wordt gebracht van de trp promotor-operator tezamen met het gen voor volledig ontwikkeld Le-IF F, zodanig dat bacteriën, die getransformeerd zijn met het gewenste plasmide, geselecteerd kunnen worden op tetracycline bevattende platen. Een representatieve kloon, die op deze wijze is bereid, is E. coli K-12 stam 294/pLeIF F trp<sup>r</sup>1.

#### Le-IF H.

Het volledige Le-IF H-gen kan geconfigureerd worden voor expressie als een volledig ontwikkeld leukocyt-interferon als volgt:

1. Plasmide pLe-IF H wordt aan Hae II en Rsa I ontsluiting onderworpen met isolatie van het 816 basispaarfragment, dat zich uitstrekt van het signaalpeptide-aminozuur 10 tot het 3' niet coderende gebied.

2. Het fragment wordt gedenatureerd en onderworpen aan herstel-synthese met Klenow-fragment, Klenow c.s., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, (1970), 168, onder toepassing van de synthetische deoxyriboöligonucleotide-inleider 5'-dATG TGT AAT CTG TCT. Deze algemene methode wordt eveneens beschreven door Goeddel c.s., U.S. Serial nr. 190799, ingediend 25 september 1980.

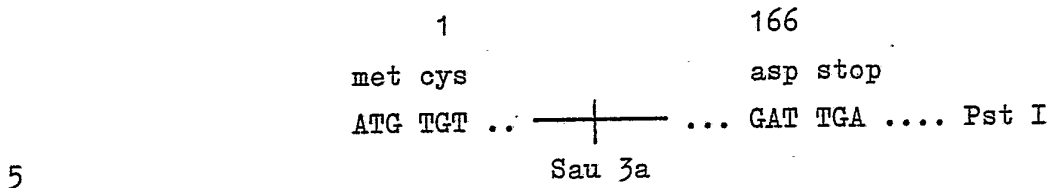
3. Het verkregen produkt wordt gesplitst met Sau 3a en een 452 basispaar ("bp") fragment, dat geïsoleerde aminozuren 1 - 150 voorstelt.

4. Sau 3a en Pst I ontsluiting van pLeIF H en isolering van het verkregen 500 b.p.-fragment geeft een gen dat aminozuren 150 tot het einde van de coderingsvolgorde codeert.

5. Fragmenten geïsoleerd bij de trappen (3) en (4) worden ver-

8105078

bonden onder vorming van een fragment:



dat de 166 aminozuren van Le-IF H codeert.

6. pLeIF A trp 25 wordt ontsloten met Xba I, stoppandig gemaakt met DNA-polymerase I en het produkt wordt ontsloten met Pst I. Het grote resulterende fragment kan geïsoleerd en verbonden worden met het produkt van trap (5) onder vorming van een expressieplasmide, dat na transformatie van E. coli K-12 stam 294 of andere gastheerbacteriën, in staat is volledig ontwikkeld Le-IF H te exprimeren.

LeIF-I

De fage  $\lambda$  Charon 4A recombinant bibliotheek van het menselijk genom geconstrueerd door Lawn c.s., Cell 15, (1978), 1157, werd gezeefd op leukocyt-interferongenen volgens methoden beschreven door Lawn c.s., zie hiervoor en Maniatis c.s., Cell 15, (1978), 687. Een radioactief LeIF-monster afkomstig van de cDNA-kloon LeIF A (Goeddel c.s., Nature 287, (1980), werd gebruikt om ongeveer 500.000 plaatjes te zeven. Zes LeIF genomklonen werden bij deze uitzeving verkregen. Na herzeving en plaatjeszuivering werd één van deze klonen,  $\lambda$ HLeIF2, uitgekozen voor verdere analyse.

Onder toepassing van de hiervoor beschreven methode kunnen andere monsters met voordeel gebruikt worden om additionele LeIF-klonen uit het menselijk genom te isoleren. Deze kunnen op hun beurt worden toegepast voor het voortbrengen van additionele leukocyt-interferonproteïnen volgens de onderhavige uitvinding.

1. Het 2000 basispaar EcoRI-fragment van de genomische kloon ( $\lambda$ HLeIF2) werd aan een subkloonbehandeling onderworpen in pBR325 bij de EcoRI-plaats. Het resulterende plasmide LeIF I werd gesplitst met EcoRI en het 2000 basispaarfragment werd geïsoleerd. Het deoxyoligonucleotide dAATTCTGCAG (een EcoRI  $\rightarrow$  Pst I convertor) werd gebonden aan het 2000 basispaar EcoRI-fragment en het verkregen produkt werd gesplitst met Pst I, waarbij een 2000 basispaarfragment verkregen werd, dat Pst I einden bevat. Dit werd gesplitst met Sau 96 en een 1100 basispaarfragment werd geïsoleerd, dat één Pst I einde en één Sau 96 einde heeft.

2. Het plasmide pLeIF C trp 35 werd ontsloten met Pst I en Xba I. Het grote fragment werd geïsoleerd.

3. Het kleine Xba I - Pst I fragment uit pLeIF C trp 35 werd

ontsloten met Xba I en Sau 96. Een 40 basispaar Xba I - Sau 96 fragment werd geïsoleerd.

4. De fragmenten geïsoleerd bij de trappen 1), 2) en 3) werden verbonden onder vorming van het expressieplasmide pLeIF I trp 1.

5

LeIF-J

1. Het plasmide pLeIF J bevat een 3,8 kilobasis Hind III-fragment van menselijk genomisch DNA, dat de LeIF J genvolgorde bevat. Een 760 basispaar Dde I - Rsa I fragment werd uit dit plasmide geïsoleerd.

10 2. Het plasmide pLeIF B trp 7 werd gesplitst met Hind III en Dde I en een 340 b.p. Hind III - Dde I fragment werd geïsoleerd.

3. Het plasmide pBR322 werd gesplitst met Pst I, stompeindig gemaakt door inkubatie met DNA Pol I (Klenow-fragment) en vervolgens ontsloten met Hind III. Het grote (≈3600 bp) fragment werd geïsoleerd.

15 4. Fragmenten geïsoleerd bij trappen 1), 2) en 3) werden verbonden onder vorming van het expressieplasmide pLeIF J trp 1.

De methoden en produkten toegepast in de volgende constructies waren zoals in de voorafgaande beschrijving. De volgende tabel A geeft de details voor bijzondere constructies van hybride LeIF plasmiden hiervan.

Tabel A.

LeIF hybride	Totale amino- zuren	Expressie plasmide (vector)	Frontgedeelte Fragment	Amino- zuren	Achtergedeelte Fragment	Amino- zuren	Resultierend expressie- plasmide
AD	165	a	Xba I-Pvu II van pLeIF A trp 25 (285 bp)	1-91	Pvu II-Pst I van pLeIF D trp 11 (~550 bp)	93-166	pLeIF AD trp (Pvu II)
DA	166	a	Xba I-Pvu II van pLeIF D trp 11 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst I van pLeIF A trp 25 (~550 bp)	92-165	pLeIF DA trp (Pvu II)
AD	165	-	Bgl II-Pst I groot frag- ment van pLeIF A trp 25	1-62	Bgl II-Pst I van pLeIF D trp 11 (~600 bp)	65-166	pLeIF AD trp (Bgl II)
DA	166	-	Bgl II-Pst II groot fragment pLeIF D trp 11	1-63	Bgl II deel-Pst I van pLeIF A trp 25 (~700 bp)	63-165	pLeIF DA trp (Bgl II)
AB	165	a	Xba I-Pvu II van LeIF A trp 25 (285 bp)	1-91	Pvu II deel-Pst I van pLeIF B trp 7 (~750 bp)	93-166	pLeIF AB trp (Pvu II)
AF	165	a	Xba I-Pvu II van LeIF A trp 25 (285 bp)	1-91	Pvu II Pst I van pLeIF F trp 1 (~700 bp)	93-166	pLeIF AF trp (Pvu II)
AG	165	a	Xba I-Pvu II van LeIF A trp 25 (285 bp)	1-91	Pvu II-Pst I van pLeIF G (~750 bp)	93-166	pLeIF AG trp (Pvu II)
AI	165	a	Xba I-Bgl II deel van pLeIF A trp 25 (~455 bp)	1-150	Bgl II-Pst I van LeIF I trp 1 (~650 bp)	151-165	pLeIF AI trp (Bgl II)
BA	166	b	Hind III-Pvu II van pLeIF B trp 7 (~630 bp)	1-92	Pvu II-Pst van pLeIF A trp 25 (~550 bp)	92-165	pLeIF BA trp (Pvu II)

Tabel A (vervolg.)

LeIF hybride	Totale aminozuren	Expressie-plasmide (vector)	Frontgedeelte Fragment	Amino-zuren	Achtergedeelte Fragment	Amino-zuren	Resultierend expressie-plasmide
BD	166	b	Hind III-Pvu II van pLeIF B trp 7 (~630 bp)	1-92	Pvu II-Pst I van pLeIF D trp 11 (~550 bp)	93-166	pLeIF BD trp (Pvu II)
BF	166	b	Hind III-Pvu II van pLeIF B trp 7 (~630 bp)	1-92	Pvu II-Pst I van pLeIF F trp 1 (~700 bp)	93-166	pLeIF BF trp (Pvu II)
BG	166	b	Hind III-Pvu II van pLeIF B trp 7 (~630 bp)	1-92	Pvu II-Pst I van pLeIF G (~750 bp)	93-166	pLeIF BG trp (Pvu II)
DB	166	a	Xba I-Pvu II van pLeIF D trp 11 (288 bp)	1-92	Pvu II deel-Pst I van pLeIF B trp 7 (~750 bp)	93-166	pLeIF DB trp (Pvu II)
DF	166	a	Xba I-Pvu II van pLeIF D trp 11 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst I van pLeIF F trp 1 (~700 bp)	93-166	pLeIF DF trp (Pvu II)
DG	166	a	Xba I-Pvu II van pLeIF D trp 11 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst van pLeIF G (~750 bp)	93-166	pLeIF DG trp (Pvu II)
FA	166	a	Xba I-Pvu II van pLeIF F trp 1 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst I van pLeIF A trp 25 (~550 bp)	92-165	pLeIF FA trp (Pvu II)
FB	166	a	Xba I-Pvu II van pLeIF F trp 1 (288 bp)	1-92	Pvu II deel-Pst I van pLeIF B trp 7 (~750 bp)	93-166	pLeIF FB trp (Pvu II)
FD	166	a	Xba I-Pvu II van pLeIF F trp 1 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst I uit pLeIF D trp 11 (~550 bp)	93-166	pLeIF FD trp (Pvu II)

Tabel A (vervolg)

LeIF hybride	Totale amino-zuren	Expressie-plasmide (vector)	Fragment	Frontgedeelte	Amino-zuren	Fragment	Amino-zuren	Achtergedeelte	Amino-zuren	Resultierend expressie-plasmide
FG	166	a	Xba I-Pvu II van F trp 1 (288 bp)	pLeIF II van pLeIF F trp 1 (288 bp)	1-92	Pvu II-Pst I uit pLeIF G (~750 bp)	93-166	Pvu II-Pst I uit pLeIF G (~750 bp)	93-166	pLeIF FG trp (Pvu II)
IA	166	a	Xba I-Bgl II van I trp 1 (~458 bp)	pLeIF II van pLeIF I trp 1 (~458 bp)	1-151	Bgl II-Pst I van	152-166	Bgl II-Pst I van	152-166	pLeIF IA trp (Bgl II)

‡ Onder uitsluiting van N-eindstandig methionine.

a Groot (~3900 bp) fragment van Xba I aan Pst I ontsluiting van pLeIF A trp 25.

b Groot (~3600 bp) fragment van Hind III aan Pst I ontsluiting van pBR322.



Onder verdere verwijzing naar tabel A zijn de vier eerst beschreven hybride LeIF's bereid uit twee LeIF expressieplasmiden. Een Bgl II plaats gemeenschappelijk met LeIF A en D cDNA's is gebruikt om een expressieplasmide pLeIF trp AD (Bgl II) te construeren, dat 5 codeert voor de 63 aminozuren met eindstandige aminogroepen van LeIF A en de 102 aminozuren met eindstandige carboxylgroepen van LeIF D. Dezelfde plaats werd gebruikt bij de constructie van een expressieplasmide pLeIF trp DA (Bgl II), dat codeert voor 64 aminozuren met eindstandige aminogroepen van LeIF D en 102 aminozuren met 10 eindstandige carboxylgroepen van LeIF A. De Pvu II plaats is gebruikt bij de constructie van twee andere hybride interferon expressieplasmiden: 91 aminozuren met eindstandige aminogroepen van A met 74 aminozuren met eindstandige carboxylgroepen van D (pLeIF trp AD (Pvu II)) en 92 aminozuren met eindstandige aminogroepen van LeIF D 15 met 74 aminozuren met eindstandige carboxylgroepen van LeIF A (pLeIF trp DA (Pvu II)). Samenvattend, voor:

pLeIF AD trp (Pvu II): het grote ( $\approx 3900$  bp) fragment van een Xba I en Pst I ontsluiting van pLeIF A trp 25 werd verbonden met een 285 bp Xba I-Pvu II fragment van pLeIF A trp 25 en een ongeveer 550 20 bp Pvu II-Pst I fragment van pLeIF D trp 11;

pLeIF DA trp (Pvu II): het grote ( $\approx 3900$  bp) fragment van een Xba I en Pst I ontsluiting van pLeIF A trp 25 werd verbonden met een 288 bp Xba I-Pvu II fragment van pLeIF D trp 11 en een ongeveer 550 bp Pvu II-Pst I fragment van pLeIF A trp 25;

25 pLeIF AD trp (Bgl II): het grote fragment uit een Bgl II, Pst I ontsluiting van pLeIF A trp 25 werd verbonden met een  $\approx 600$  bp Bgl II-Pst I fragment uit pLeIF D trp 11; en

pLeIF DA trp (Bgl II): het grote fragment uit een Bgl II en Pst I ontsluiting van pLeIF D trp 11 werd verbonden aan een ongeveer 30 700 bp fragment verkregen door Pst I splitsing van pLeIF A trp 25 gevolgd door partiële Bgl II ontsluiting.

In het vijfde voorgestelde hybride:

pLeIF AB trp (Pvu II): het grote ( $\approx 3900$  bp) fragment van een Xba I en Pst I ontsluiting van pLeIF A trp 25 werd verbonden met een 35 285 bp Xba I - Pvu II fragment van pLeIF A trp 25 en een ongeveer 750 bp Pvu II (partieel) - Pst I fragment van pLeIF B trp 7.

Op soortgelijke wijze worden de andere constructies voorgesteld in tabel A aldus gedefinieerd. Als een verder voorbeeld kan men bij de constructie van een LeIF C en/of LeIF H deel bevattend hybride, 40 voordeel trekken van gemeenschappelijke Bbv I plaatsen, die voorko-

men bij ongeveer nucleotide 294 (dat wil zeggen GCTGC) van de gen-  
volgorden.

Op dezelfde manier kunnen plasmiden die geschikt zijn voor de  
microbiële expressie van andere nieuwe hybride leukocyt-interferons  
5 gevormd worden door geschikte manipulatie van dubbelstrengig DNA,  
onder het coderen van alle of een deel van de aminozuurvolgorden van  
in de natuur voorkomende leukocytinterferons. Derhalve wordt een  
eerste dubbelstrengig DNA-fragment geselecteerd, dat het eindstan-  
dige aminodeel van een eerste, in de natuur voorkomende leukocyt-  
10 interferon aminozuurvolgorde codeert en eruit voortkomende in de 3'-  
richting, een aanzienlijk deel van de aminozuurvolgorde ervan. Het  
fragment bevat een restrictie endonuclease splitsingsplaats voor ge-  
plaatste aangrenzende codons voor aminozuur "n" van het eerste leu-  
kocyt-interferon, n-aminozuren, die een aanzienlijk deel van de  
15 aminozuurvolgorde van het eerste interferon vormen. Splitsing met  
het restrictie endonuclease geeft een fragment, dat het eindstandige  
amino van het eerste interferon en codons voor ongeveer n aminozuren  
bevat. Een tweede fragment, dat alle of een deel van de codons voor  
de aminozuurvolgorde van een tweede, verschillend leukocyt-interfe-  
20 ron bevat, wordt geselecteerd, waarbij het fragment een splitsings-  
plaats bevat voor een identiek restrictie endonuclease geplaatst  
aangrenzende codons voor dat aminozuur van het tweede interferon,  
waarvan het aminozuurgetal (voortkomend uit het eindstandige amino  
van het tweede interferon) ongeveer 166-n is. Splitsing van het twee-  
25 de fragment met dat restrictie endonuclease geeft een produkt, dat  
complementair is voor het "n" eindstandige deel van het ontsluitings-  
produkt van het eerste fragment, zodanig dat het ontsluitingsprodukt  
van het tweede verbonden kan worden met dat van het eerste, onder  
het opnieuw vormen van de restrictie endonuclease herkenningsplaats  
30 en het opnieuw samenstellen van het codon voor aminozuur en van het  
eerste interferon, waar verloren gegaan bij de initiële ontsluiting.  
Het produkt van de restrictie endonuclease ontsluiting van het twee-  
de fragment komt bij voorkeur voort uit het einde, dat resulteert  
uit splitsing in de 3'-richting door nucleotiden, die de eindstandi-  
35 ge carboxylgroepen van het tweede leukocyt-interferon coderen.

Ook kunnen hybriden, die aanzienlijke hoeveelheden van de ami-  
nozuurvolgorden van meer dan twee in de natuur voorkomende leukocyt-  
interferons bevatten, gevormd worden, in welk geval bijvoorbeeld het  
hiervoor vermelde tweede fragment additioneel gekozen wordt om een  
40 tweede restrictie endonucleaseplaats stroomafwaarts van de eerste te

8105078

bevatten, waarbij de tweede plaats identiek is aan een soortgelijk opgestelde plaats binnen een fragment, dat het eindstandige carboxydeel van een derde leukocyt-interferon codeert, enz. In het aangehaalde voorbeeld kunnen de produkten van opeenvolgende restrictie 5 endonuclease-bewerkingen drievoudig verbonden worden onder vorming van een hybride-gen, dat het eindstandige aminodeel van een eerste interferon, de middentrajekt-aminozuurvolgorde van het tweede en het eindstandige carboxydeel van het derde (of volgens een andere variatie van het eerste, wanneer de eerste en derde interferons dezelfde 10 zijn) codeert.

Bij voorkeur is het hiervoor vermelde eerste fragment afkomstig van een expressieplasmide, dat wil zeggen één waarin codons voor het eindstandige aminodeel van het eerste leukocyt-interferon zijn vooraf gegaan door een ATG of een ander vertalingsinitiëeringscodon en 15 een promotor of promotor-operatorsysteem. Als resultaat zal het hiervoor beschreven eindprodukt van de manipulerende bewerkingen een plasmide zijn, dat in staat is het polypeptide uit te drukken, dat gecodeerd is door het hybridegen in bacteriën of andere microbiële organismen, die met het plasmide zijn getransformeerd. Andere 20 middelen voor het configureren van het hybridegen voor microbiële expressie zullen voor de deskundige duidelijk zijn.

Bij voorkeurs-uitvoeringsvormen van de uitvinding coderen de hybridegenen een nieuwe leukocyt-interferon aminozuurvolgorde van ongeveer 165 - 166 aminozuren, die een conjugaat vormen van in hoofd- 25 zaak aminozuurvolgorden zoals voorgesteld in fig. 3. Het meest bij voorkeur bevatten de nieuwe leukocyt-interferons, gecodeerd door de hybridegenen, de aminozuren, gespecificeerd en geplaatst zoals aangegeven in de volgorde "All" van fig. 3. De expressieprodukten van plasmiden gevormd volgens de uitvinding kunnen onderzocht worden op 30 antiviraliteit op gebruikelijke wijze, zoals bij de biologische activiteitsbepalingen hierna beschreven.

#### Aantonen van antiviraliteit.

*E. coli* K-12 stam 294 werd op gebruikelijke wijze getransformeerd met onafhankelijk, de plasmiden pLeIF trp A 25, pLeIF trp D, 35 pLeIF trp A/D (Bgl II) en pLeIF trp D/A (Bgl II). De transformanten werden gescheiden gekweekt in kulturen van 5 ml in L-vloeistof, die 5 mg/ml tetracycline bevatte tot een  $A_{550}$  van ongeveer 1,0 en werden vervolgens verdund in één liter van M9 media, die 5  $\mu$ g/ml tetracycline bevatten. Cellen werden verzameld wanneer  $A_{550}$  de waarde 40 1,0 had bereikt en celkorrels werden gesuspenderd in 10 ml 15% su-

8105078

crose, 50 mmol tris-HCl (pH 8,0), 50 mmol EDTA. 10 mg lysozyme werden toegevoegd en na 5 minuten bij 0°C werden cellen door geluidsgolven gebroken. De monsters werden 10 minuten bij 15.000 omwentelingen per minuut gecentrifugeerd in een Sorvall SM-24 rotor. De interferonactiviteit in de bovenstaande vloeistoffen werd onderworpen aan een proef op de antiviruseactiviteit.

De opbrengsten per liter cultuurvloeistof van deze interferons, getitreerd op een menselijke celreeks (WISH) worden in tabel B aangegeven, waaruit blijkt, dat LeIF-A/D activiteit in een grotere hoeveelheid wordt voortgebracht dan de andere interferons. Dit verschil kan een gevolg zijn van de grotere intrinsieke activiteit van het LeIF-A/D of aan een grotere opbrengst uitgedrukt in mg proteïne van dit interferon. Omdat de genetische verbinding identiek was voor al deze interferons, lijkt het het meest waarschijnlijk, dat LeIF-A/D essentieel een grotere activiteit heeft dan de andere interferons.

Tabel B.

Opbrengst van leukocyt-interferons uit schud-  
kolfkultures van E. coli.

Type interferon	Activiteit opbrengst/liter (eenheden op WISH) <sup>‡</sup>
A	8x10 <sup>7</sup>
D	5x10 <sup>6</sup>
AD (Bgl II)	2x10 <sup>8</sup>
DA (Bgl II)	1x10 <sup>6</sup>

‡ Bepaald door remming van het cytopathische effect op WISH-cellen met VSV als opwekmiddel.

De potentie van de verschillende interferons in een reeks zoogdiercelreeksen werd bepaald (mens, WISH; Afrikaanse groene aap, VERO; hamster-fibroblast, BHK; konijneniercellen, RK-13; muis L-929 en rundernier, MDBK-cellen). Teneinde de relatieve activiteit van de interferons te vergelijken werd hun activiteit op verschillende cellen berekend in verband met hun activiteit op WISH-cellen, die als 100 worden genomen. De resultaten in tabel C laten zien, dat LeIF-A/D een zeer grote activiteit in VERO en L-929 cellen heeft, terwijl LeIF-D/A een geringe activiteit heeft in deze celreeksen. Deze resultaten wijzen erop, dat de combinatie van het N-eindstandige deel van LeIF-A en het C-eindstandige deel van LeIF-D binnen één molecuul (LeIF-A/D) van het hybrideproteïne een bijzondere potentie verleent, die manifest is in verschillende zoogdiersoorten. Bovendien zijn deze eigenschappen niet eenvoudig de som van de eigenschappen van de

kouderinterferons. Dit blijkt duidelijk in het geval van de activiteit op L-929 cellen (tabel C), in welk geval noch een mengsel van LeIF-A en LeIF-D noch het andere hybride, LeIF-D/A, duidelijke activiteit heeft.

5

Tabel C.

Titratie van verschillende leukocyt-interferons in celreeksen van verschillende zoogdiersoorten.

Celreeks	Leukocyt-interferons <sup>‡</sup>					Buffy-coat
	A	D	A/D	D/A	A+D	
10 WISH	100	100	100	100	100	100
VERO	250	75	1670	20	200	200
BHK	400	200	833	2000	400	20
RK-13	12	500	6	n.b.	n.b.	120
L-929	150	5	3300	2	10	0,1

15 ‡ Interferons onderzocht tegen VSV-infektie van de verschillende celreeksen. Activiteiten uitgedrukt als percentage activiteit waargenomen in WISH-cellen.

De activiteit van LeIF-A/D tegen andere virussen werd eveneens onderzocht. De gegevens in fig. 5 laten antiviruseffekten zien tegen  
 20 EMC-virusinfektie van L-cellen en de gegevens in fig. 6 laten de effecten zien tegen VSV-infektie van L-cellen. Het is uit deze gegevens duidelijk, dat de grotere activiteit van LeIF-A/D niet beperkt is tot één virus (VSV) en de grotere activiteit ervan is waarschijnlijk een algemene eigenschap tegen vele virussen. Natuurlijke menselijke  
 25 leder-kolder interferonpreparaten hebben geen effect tegen muisellen (zie tabel B). De activiteit van LeIF-A/D tegen EMC-virusinfektie van CD-1 muizen werd daarom onderzocht. De resultaten in fig. 7 laten zien, dat LeIF-A/D uiterst potent is tegen  
 30 lethale EMC-virusinfektie en dat LeIF-A eveneens antiviruseffekt heeft, zoals verwacht kan worden uit de activiteit in de celreeksen (tabel B). De gegevens in fig. 7 resulteren uit intraperitoneale behandelingen 3 uren voor de infektie. Doses van LeIF-A/D en LeIF-A worden als zodanig getitreerd op WISH.

Lethale EMC-virusinfektie van hamsters doet zich eveneens voor  
 35 door LeIF-A/D en LeIF-A (fig. 8), waarbij de eerstgenoemde het meest effectief is en leren kolderinterferon laat slechts een klein en statistisch onbetekenend effect zien. In het geval van fig. 8 werden alle interferons intraperitoneaal toegediend 3 uren voor de infektie met een dosering van  $5 \times 10^5$   $\mu\text{g}/\text{kg}$ , getitreerd op WISH-cellen.

8105078

Deze resultaten geven aan, dat de uitgesproken antiviruseffekten van LeIF-A/D in een reeks van zoogdiersoorten niet beperkt wordt tot celkultures, maar ook wordt waargenomen bij lethale virusinfecties.

- 5 EMC-virus kan als een modelsysteem worden beschouwd, een demonstratie van antiviruseffekt tegen wat voorspellend kan zijn van antiviruseffekt tegen de voorgestelde groep virussen, dat wil zeggen de picornavirusgroep waarvan mond- en klauwzeer en polio leden zijn. VSV-virus kan worden opgevat als een modelsysteem, een demonstratie van antiviruseffekt tegen wat voorspelbaar kan zijn van antiviruseffekt tegen de voorgestelde groep virussen, dat wil zeggen de rhabdovirusgroep, waarvan rabies een belangrijk lid is.

Tabel D somt de activiteiten in tabelvorm op van verschillende van de LeIF-hybriden ervan op WISH en MDBK-cellen en de activiteitsverhoudingen daarvan:

Tabel D.

LeIF-hybride (PvuII)		Eenheden/liter kultuur WISH-cellen	Eenheden/liter kultuur MDBK-cellen	Verhouding ac- tiviteiten WISH/MDB
20	AB	$2,4 \times 10^8$	$4 \times 10^7$	6
	AD	$1,2 \times 10^8$	$2 \times 10^7$	6
	AF	$6 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	6
	AG	$4 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	2,7
	AI	$3,2 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	2,7
25	BA	$1,5 \times 10^7$	$1 \times 10^7$	1,5
	BD	$6 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	4
	BF	$1 \times 10^6$	$3,5 \times 10^5$	0,3
	BG	$2 \times 10^7$	$6 \times 10^7$	0,3
	DA	$3 \times 10^6$	$1,2 \times 10^8$	0,025
30	DB	$2 \times 10^6$	$5 \times 10^7$	0,04
	DF	$2 \times 10^5$	$4 \times 10^6$	0,05
	DG	$2 \times 10^5$	$1,5 \times 10^7$	0,014
	FA	$2 \times 10^5$	$6 \times 10^7$	0,003
	FB	$2 \times 10^6$	$8 \times 10^7$	0,025
35	FD	$1 \times 10^7$	$2 \times 10^7$	0,5
	FG	$1 \times 10^6$	$4 \times 10^7$	0,025
	IA	$2,4 \times 10^6$	$6 \times 10^7$	0,04
	A <sup>≠</sup>	$8 \times 10^7$	$1,2 \times 10^8$	0,7
	B <sup>≠</sup>	$8 \times 10^7$	$4 \times 10^8$	0,2
40	C <sup>≠</sup>	$2 \times 10^7$	$1,5 \times 10^7$	1,3

8105078

Tabel D (vervolg)

LeIF-hybride (PvuII)		Eenheden/liter kultuur WISH-cellen	Eenheden/liter kultuur MDBK-cellen	Verhouding ac- tiviteiten WISH/MDB
5	D <sup>‡</sup>	$5 \times 10^6$	$2,5 \times 10^7$	0,2
	F <sup>‡</sup>	$2 \times 10^7$	$2 \times 10^8$	0,1
	I <sup>‡</sup>	$1,6 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$	1,3

‡ Voor vergelijkingsdoeleinden.

Parenterale toediening.

10 De hybride leukocyt-interferons hiervan kunnen parenteraal wor-  
den toegediend aan individuen, die een antitumor of antivirusbehan-  
deling nodig hebben en aan die individuen, die immunosuppressieve  
toestanden vertonen. Dosering en doseringssnelheid kunnen parallel  
zijn aan wat thans in gebruik is bij klinische onderzoeken van  
15 van de mens afkomstige materialen, bijvoorbeeld ongeveer  $(1-10) \times$   
 $10^6$  eenheden per dag en in het geval van produkten met een grotere  
zuiverheid dan 1%, bijvoorbeeld tot  $5 \times 10^7$  eenheden per dag. Voorlo-  
pige indikaties bij het hiervoor beschreven onderzoek bij apen sug-  
gereren dat doseringen van bacterieel verkregen Le-IF aanzienlijk  
20 kunnen worden verhoogd voor een groter effect, toe te schrijven aan  
de essentiële afwezigheid van menselijke proteïnen anders dan Le-IF,  
welke proteïnen in van leukocyt afgeleide produkten kunnen fungeren  
als pyrogenen, die ongunstige effecten laten zien, bijvoorbeeld ma-  
laise, temperatuurverhoging, enz.

25 Als één voorbeeld van een geschikte doseringsvorm voor in hoofd-  
zaak homogeen bacterieel Le-IF in parenterale vorm, hier mutatis mu-  
tandis toepasbaar, kunnen 3 mg Le-IF van specifieke activiteit van  
bijvoorbeeld  $2 \times 10^8$  eenheden/mg worden opgelost in 25 ml 5 N serum-  
albumine (menselijk) - USP, kan de oplossing worden geleid door een  
30 bacteriologisch filter en kan de gefiltreerde oplossing aseptisch  
worden onderverdeeld in 100 flesjes, die elk  $6 \times 10^6$  eenheden zuiver  
interferon bevatten, dat geschikt is voor parenterale toediening.  
De flesjes worden bij voorkeur in de koude ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) vóór gebruik op-  
geslagen.

35 De verbindingen van de onderhavige uitvinding kunnen geformu-  
leerd worden volgens bekende methoden voor de bereiding van farma-  
ceutisch geschikte preparaten, waarbij het polypeptide in mengsel ge-  
combineerd wordt met een farmaceutisch aanvaardbare drager. Geschikte  
dragers en hun formulering zijn beschreven in Remington's Pharmaceu-  
40 tical Sciences door E.W. Martin. Dergelijke preparaten zullen een

8105078

werkzame hoeveelheid bevatten van het interferon-proteïne tezamen met een geschikte hoeveelheid drager teneinde farmaceutisch aanvaardbare samenstellingen te bereiden, die voor een effectieve toediening aan de gastheer geschikt zijn.

8105078



C O N C L U S I E S

1. Antiviraal polypeptide van ongeveer 165 - 166 aminozuren, waarvan de aminozuurvolgorde van het polypeptide in volgorde afzonderlijke sub-volgorden bevat, die overeenkomen in aminozuuridentiteit 5 en aantal met sub-volgorden van verschillende, in de natuur voorkomende leukocyt-interferons, waarbij de aminozuurvolgorde van het polypeptide in totale samenstelling verschilt van de aminozuurvolgorde van in de natuur voorkomende leukocyt-interferons.
2. Polypeptide volgens conclusie 1, waarvan het N-eindstandige 10 deel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 1 - 92 van LeIF-D en het eindstandige carboxyldeel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 92 - 165 van LeIF-A.
3. Polypeptide volgens conclusie 1, waarvan het N-eindstandige deel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 1 - 91 van LeIF-A en het 15 eindstandige carboxyldeel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 93 - 166 van LeIF-D.
4. Polypeptide volgens conclusie 1, waarvan het N-eindstandige deel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 1 - 63 van LeIF-D en het eindstandige carboxyldeel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 63 - 20 165 van LeIF-A.
5. Polypeptide volgens conclusie 1, waarvan het N-eindstandige deel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 1 - 62 van LeIF-A en het eindstandige carboxyldeel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 64 - 166 van LeIF-D.
- 25 6. Polypeptide volgens conclusie 1, waarvan het N-eindstandige deel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 1 - 91 van LeIF-A en het eindstandige carboxyldeel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 93 - 166 van LeIF-B.
7. Polypeptide volgens conclusie 1, waarvan het N-eindstandige 30 deel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 1 - 91 van LeIF-A, het eindstandige carboxyldeel in hoofdzaak bestaat uit aminozuren 93 - 166 van LeIF-F.
8. Dubbelstrengig DNA, dat een streng bevat, die een polypeptide volgens elk van de conclusies 1 - 5 codeert.
- 35 9. Dubbelstrengig DNA, dat een streng bevat, die een polypeptide volgens conclusies 6 en 7 codeert.
10. Repliceerbare, plasmideachtige expressiedrager, die in staat is in een transformant microorganisme een polypeptide volgens elk van de conclusies 1 - 5 uit te drukken.
- 40 11. Repliceerbare, plasmideachtige expressiedrager, die in

8105078

staat is in een transformant microörganisme een polypeptide volgens conclusie 6 en 7 uit te drukken.

12. Transformant microörganisme, dat de expressiedrager van conclusie 10 bevat.

5 13. Transformant microörganisme, dat de expressiedrager van conclusie 11 bevat.

14. Plasmide gekozen uit de groep bestaande uit pLeIF AD trp (Bgl II), pLeIF AD trp (Pvu II), pLeIF DA trp (Bgl II) en pLeIF DA trp (Pvu II).

10 15. Plasmide gekozen uit de groep bestaande uit pLeIF AB (Pvu II) en pLeIF AF (Pvu II).

16. Werkwijze voor het vormen van een dubbelstrengig DNA volgens conclusies 8 of 9, m e t h e t k e n m e r k , dat men

15 a. een eerste, dubbelstrengig DNA-fragment selecteert, dat codons bevat, die de totale of een deel van de aminozuurvolgorde coderen van een eerste, in de natuur voorkomend leukocyt-interferon, welk fragment codons omvat voor het eindstandige aminodeel van het interferon en op een afstand in de 3'-richting daarvan een eerste restrictie endonuclease splitsingsplaats;

20 b. het fragment met de restrictie endonuclease splitst;

c. een tweede dubbelstrengig DNA-fragment selecteert, dat de gehele of een deel van de aminozuurvolgorde van een tweede, verschillend, in de natuur voorkomend leukocyt-interferon codeert, welk tweede fragment een identieke restrictie endonuclease splitsingsplaats bevat, die in hoofdzaak identiek geplaatst is vanuit het oogpunt van de aminozuurnummering van de twee interferons en bovendien voorbij deze plaats codons bevat voor het eindstandige carboxyldeel van het tweede interferon;

d. het tweede fragment met de restrictie endonuclease splitst en

30 e. restrictie endonuclease ontsluitingsprodukten van de trappen b en d verbindt voor het herstel van de restrictie endonucleaseplaats en een hybridefragment vormt, dat in volgorde codons bevat voor het eindstandige aminodeel van het eerste interferon en het eindstandige carboxyldeel van het tweede interferon.

35 17. Werkwijze voor de vorming van een antiviraal polypeptide volgens elk van de conclusies 1 - 7, m e t h e t k e n m e r k , dat men

a. het hybride DNA-fragment afkomstig van de werkwijze volgens conclusie 16 laat ontplooiën binnen een repliceerbare plasmideachtige expressiedrager, een microörganisme daarmee transformeert, het

8105078

microörganisme kweekt en de expressie van het polypeptide, gecodeerd door het hybride DNA-fragment laat plaats hebben en

b. het verkregen microörganisme laat lyseren en daaruit het polypeptide wint.

5 18. Farmaceutisch preparaat, dat een therapeutisch werkzame hoeveelheid van een polypeptide volgens één of meer van de conclusies 1 - 7 en een farmaceutisch aanvaardbare drager bevat.

19. Toepassing van het polypeptide volgens één of meer van de conclusies 1 - 7 bij de behandeling van virale of neoplastische ziekten of voor de bereiding van farmaceutische preparaten, die  
10 voor een dergelijke behandeling geschikt zijn.

20. Produkten en werkwijzen voor hun bereiding zoals hiervoor beschreven.

=====



fig. 2

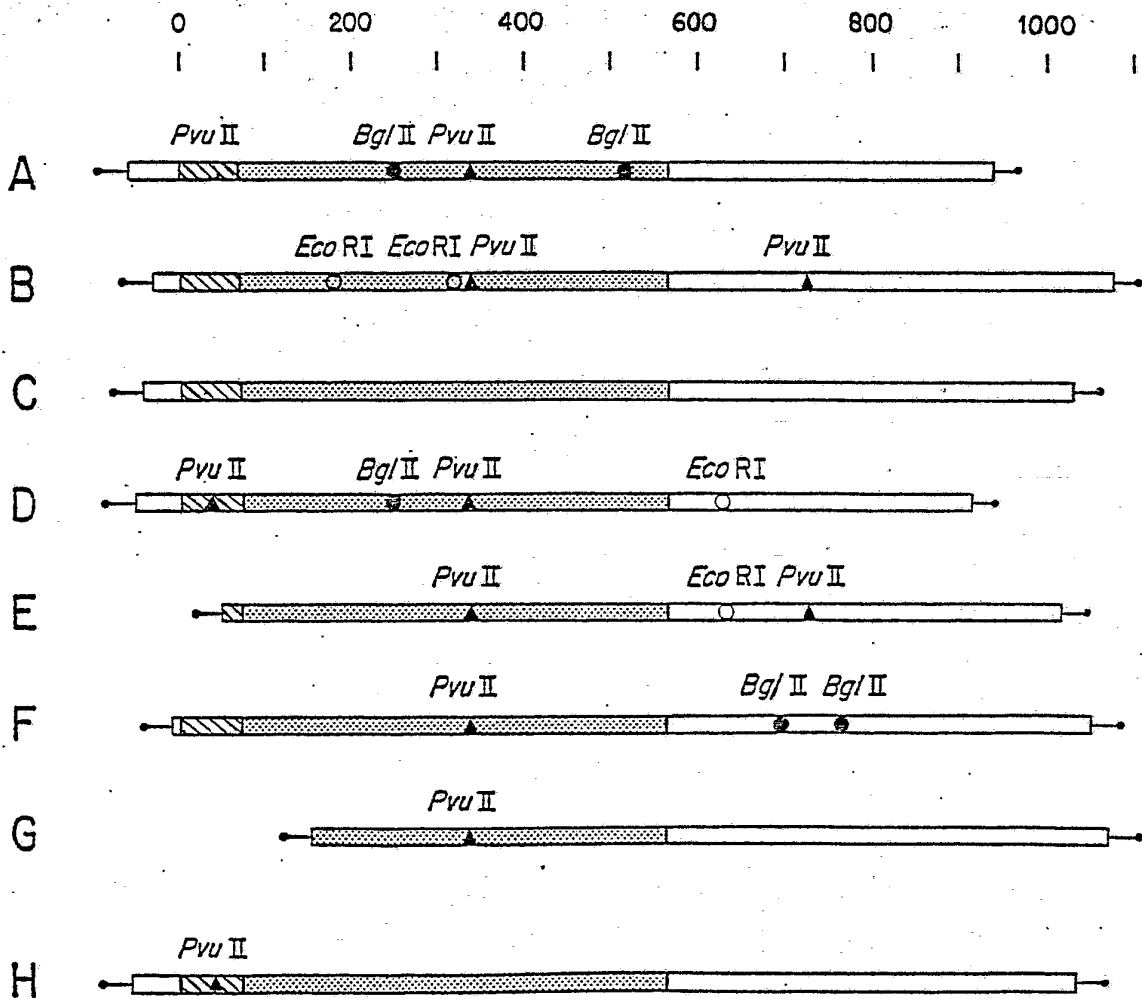


Fig. 3

51  
510  
520  
530  
10  
20  
30  
40  
leif A M.A.L.T.F.A.L.L.V.A.L.L.V.L.S.C.K.S.S.C.S.S.V.G.C.D.L.P.Q.T.H.S.L.G.S.R.R.R.T.L.L.M.L.L.A.Q.M.R.R.K.I.S.L.F.S.S.C.L.K.D.R.H.O.F.F.G.P.P.Q  
leif B M.A.L.T.F.Y.L.L.M.V.A.L.V.L.V.L.S.Y.K.S.I.C.S.S.L.G.C.D.L.P.P.Q.T.H.S.L.G.N.R.R.R.A.L.I.L.L.G.Q.M.G.R.I.S.P.F.S.S.C.L.K.D.R.H.O.F.F.R.I.P.P.Q  
leif C H.A.S.P.F.A.L.L.E.M.V.L.V.L.S.C.K.S.L.P.L.L.G.C.C.O.L.P.P.E.T.H.S.L.D.N.R.R.R.A.F.I.L.L.T.Q.M.R.R.I.S.P.F.S.S.Y.L.K.K.D.R.H.O.F.F.O.F.P.P.H  
leif E M.A.L.S.F.S.L.L.M.A.V.L.V.L.S.Y.K.S.I.C.S.L.L.G.C.C.O.L.P.P.Q.T.H.S.L.G.N.R.R.R.A.L.I.L.L.A.Q.M.G.R.I.S.P.F.S.S.C.L.K.D.R.H.O.F.F.G.F.F.P.P.Q  
leif F M.A.L.P.F.S.L.N.M.A.L.V.V.L.S.C.K.S.S.C.S.L.G.C.N.L.S.Q.T.H.S.L.N.N.R.R.T.L.M.L.M.A.Q.M.R.R.I.S.P.F.S.S.C.L.K.D.R.H.O.F.F.E.F.F.P.P.Q  
leif G  
leif H

50  
60  
70  
80  
90  
100  
leif A E.E.F.F.D.G.H.Q.F.Q.K.A.Q.A.E.T.I.P.V.L.H.E.M.I.Q.Q.I.F.N.L.F.S.T.K.D.S.S.A.A.N.D.E.T.L.L.L.D.K.F.Y.T.E.L.L.Y.Q.Q.L.N.D.L.E.A.C.V.I.Q.G  
leif B E.E.F.F.D.G.H.Q.F.Q.K.A.Q.A.I.S.V.L.H.E.M.I.Q.Q.T.F.N.L.F.S.T.K.D.S.S.A.A.W.E.D.E.T.L.L.L.D.E.F.F.Y.I.E.L.L.D.Q.Q.L.N.D.L.E.A.C.V.I.Q.E  
leif C E.E.F.F.D.G.H.Q.F.Q.K.A.P.A.I.S.V.L.H.E.M.I.Q.Q.I.F.N.L.F.S.T.K.D.S.S.A.A.W.E.D.E.T.L.L.L.D.K.K.F.C.T.E.L.L.Y.Q.Q.L.N.D.L.E.A.C.V.M.\*K  
leif D O.V.F.H.G.H.H.F.Q.K.A.Q.A.I.S.V.L.H.E.M.I.Q.Q.T.F.N.L.F.S.T.K.D.S.S.A.A.T.W.E.Q.S.L.L.L.D.K.F.F.Y.T.E.L.L.Y.Q.Q.L.N.D.L.E.A.C.V.M.Q.E  
leif E E.E.F.F.D.G.H.Q.F.Q.K.A.Q.A.I.S.V.L.H.E.M.I.Q.Q.T.F.N.L.F.S.T.K.D.S.S.A.A.T.W.E.Q.S.L.L.L.D.K.F.F.Y.T.E.L.L.Y.Q.Q.L.N.D.L.E.A.C.V.M.Q.E  
leif F E.E.F.F.D.G.H.Q.F.Q.K.A.Q.A.I.S.V.L.H.E.M.I.Q.Q.T.F.N.L.F.S.T.K.D.S.S.A.A.T.W.E.Q.S.L.L.L.D.K.F.F.Y.T.E.L.L.Y.Q.Q.L.N.D.L.E.A.C.V.M.Q.E  
leif G E.E.F.F.D.G.H.Q.F.Q.K.A.Q.A.I.S.V.L.H.E.M.I.Q.Q.T.F.N.L.F.S.T.K.D.S.S.A.A.T.W.E.Q.S.L.L.L.D.K.F.F.Y.T.E.L.L.Y.Q.Q.L.N.D.L.E.A.C.V.M.Q.E  
leif H

110  
120  
130  
140  
150  
160  
166  
A11 E.E.F.F.D.G.E.Q.R.A.I.V.L.H.E.Q.Q.E.N.L.F.T.S.S.A.L.L.F.E.L.Q.Q.N.D.E.Q  
leif A V.G.V.Y.T.E.T.P.L.M.K.E.D.S.I.L.L.A.V.R.R.K.Y.F.Q.R.I.T.L.Y.L.K.E.K.K.Y.S.P.C.A.M.E.V.V.R.A.E.I.M.R.S.F.S.L.S.T.N.L.Q.E.S.L.R.S.K.E  
leif B V.G.V.Y.I.E.S.P.L.M.Y.E.D.S.I.L.L.A.V.R.R.K.Y.F.Q.R.I.T.L.Y.L.I.E.R.K.K.Y.S.P.C.A.M.E.V.V.R.A.E.I.M.R.S.L.S.F.S.T.N.L.Q.K.R.L.R.R.K.E  
leif C E.R.V.Y.G.E.T.P.L.M.H.V.D.S.I.L.L.A.V.R.R.K.Y.F.Q.R.I.T.L.Y.L.T.E.K.K.Y.S.P.C.A.M.E.V.V.R.A.E.I.M.R.S.S.L.S.T.N.L.Q.E.R.L.R.R.K.E  
leif D V.G.V.Y.E.E.T.P.L.M.H.V.D.S.I.L.L.A.V.R.R.K.Y.F.Q.R.I.T.L.Y.L.T.E.K.K.Y.S.P.C.A.M.E.V.V.R.A.E.I.M.R.S.S.L.S.T.N.L.Q.E.R.L.R.R.K.E  
leif E V.G.V.Y.E.E.T.P.L.M.H.V.D.S.I.L.L.A.V.R.R.K.Y.F.Q.R.I.T.L.Y.L.T.E.K.K.Y.S.P.C.A.M.E.V.V.R.A.E.I.M.R.S.S.L.S.T.N.L.Q.E.R.L.R.R.K.E  
leif F V.G.V.Y.E.E.T.P.L.M.H.V.D.S.I.L.L.A.V.R.R.K.Y.F.Q.R.I.T.L.Y.L.T.E.K.K.Y.S.P.C.A.M.E.V.V.R.A.E.I.M.R.S.S.L.S.T.N.L.Q.E.R.L.R.R.K.E  
leif G V.G.V.Y.E.E.T.P.L.M.H.V.D.S.I.L.L.A.V.R.R.K.Y.F.Q.R.I.T.L.Y.L.T.E.K.K.Y.S.P.C.A.M.E.V.V.R.A.E.I.M.R.S.S.L.S.T.N.L.Q.E.R.L.R.R.K.E  
leif H

fig. 4

LeIF A	1	CYS	ASP	LEU	PRO	GLN	THR	HIS	SER	LEU	GLY	SER	ARG	ARG	THR	LEU	MET	LEU	ALA	GLN	MET	ARG	LYS	ILE	SER	LEU	PHE	SER	CYS	LEU	LYS	ASP	ARG	HIS
LeIF D						GLU			ASP	ASN																								
LeIF A																																		
LeIF D																																		
LeIF A																																		
LeIF D																																		
LeIF A																																		
LeIF D																																		

fig.5

EMC VIRUS IN L-CELLEN

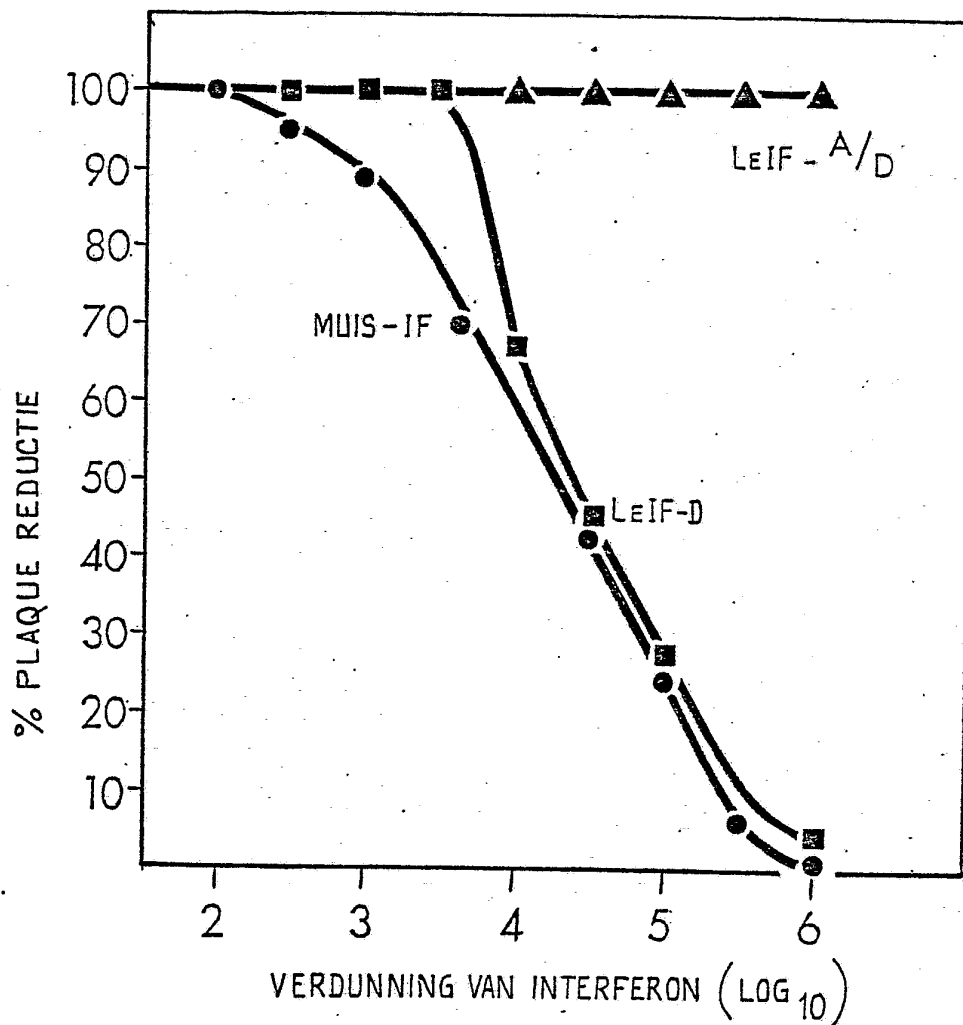
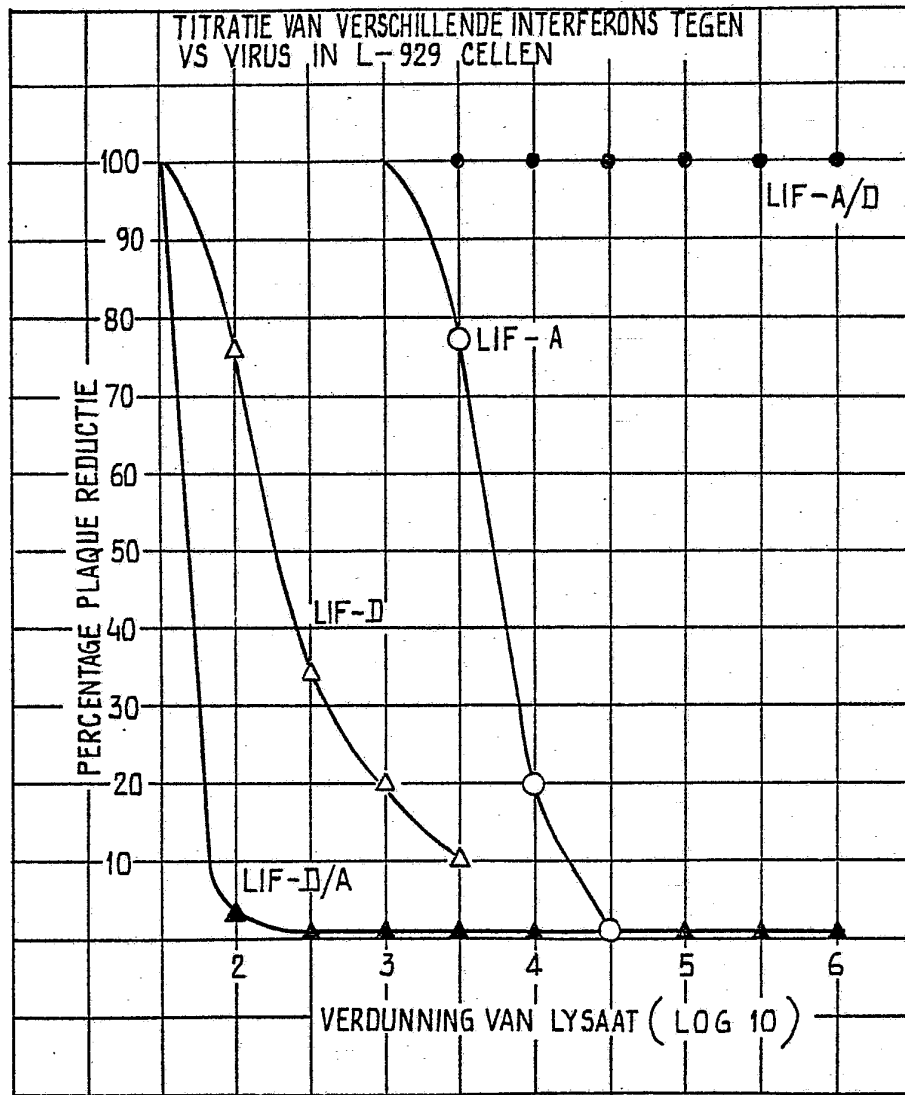




fig. 6



8105078

fig. 7

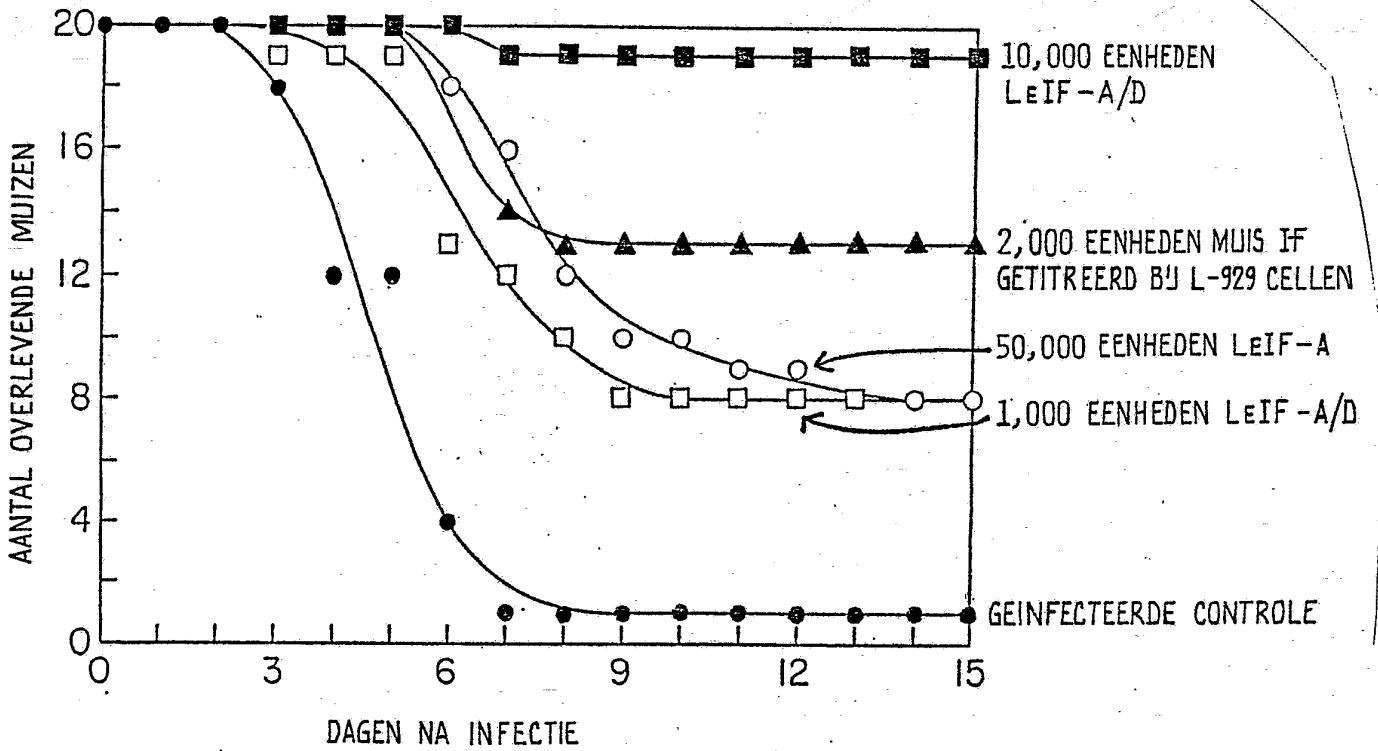
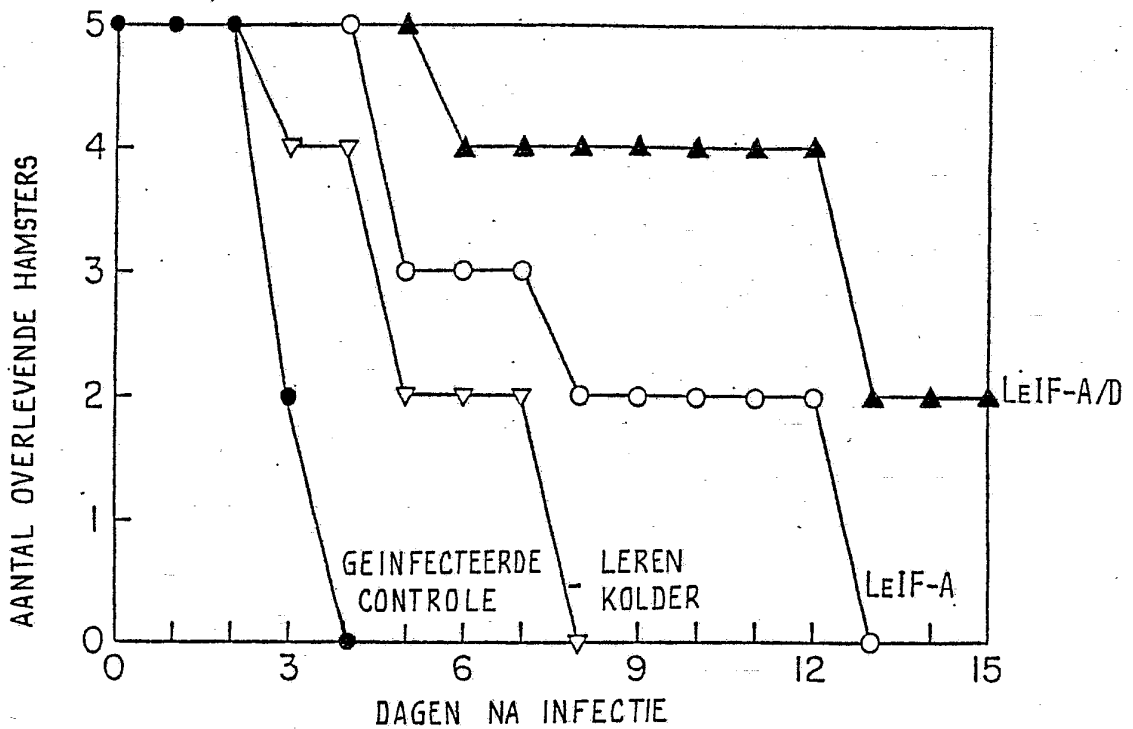


fig. 8



8105078

# fig. 9

A  
H  
I  
J  
C

GTATGTTCCCTA  
GTATGTTCCCTA  
GTATGTTCCCTA  
GTATGTTCACTA  
GTATGTTCACTA

A  
H  
I  
J  
C

TTTAAGGC-TAGGCACAAGCAAGGCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCACCCATT-TCAACCAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA  
TTTAAGGC-TAGGCACAAGCAAGGCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCACCCATT-TCAACCAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA  
TTTAAGGC-TAGGCACAAGCAAGGCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCACCCATT-TCAACCAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA  
TTTAAGGC-TAGGCACAAGCAAGGCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCACCCATT-TCAACCAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA  
TTTAAGGC-TAGGCACAAGCAAGGCTTCAGAGAACCTGGAGCCTAAGGTTTAGGCTCACCCATT-TCAACCAGTCTAGCAGCATCTGCAACATCTACA

A  
H  
I  
J  
C

+1  
ATGCGCTTGGCTTTGCTTACTGGTGGCCCTCTGGTGTCTAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTGATCTGCCCAAACCCACAGCCCTGGGTA  
ATGCGCTTGGCTTTGCTTAAATGATGGCCCTGGTGGTGTCTAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTAACTGTCTCAAACCCACAGCCCTGGATA  
ATGCGCTTGGCTTTGCTTAAATGATGGCCCTGGTGGTGTCTAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTAACTGTCTCAAACCCACAGCCCTGGATA  
ATGCGCTTGGCTTTGCTTAAATGATGGCCCTGGTGGTGTCTAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTAACTGTCTCAAACCCACAGCCCTGGATA  
ATGCGCTTGGCTTTGCTTAAATGATGGCCCTGGTGGTGTCTAGCTGCAAGTCAAGCTGCTCTGTGGGCTGTAACTGTCTCAAACCCACAGCCCTGGATA

A  
H  
I  
J  
C

200  
GCAGGAGGACCTTGTGCTCTGGCACAGTAGGAGAACTCTCTTTCTCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGATTT--  
ACAGGAGGACCTTGTGCTCTGGCACAGTAGGAGAACTCTCTTTCTCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGAATTTCCCCAGGAGGAAATTTGA  
ATAGGAGGACCTTGTGCTCTGGCACAGTAGGAGAACTCTCTTTCTCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGGATTTCCCCAGGAGGATTTGA  
ATAGGAGGACCTTGTGCTCTGGCACAGTAGGAGAACTCTCTTTCTCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTGAATTTCCCCAGGAGGATTTGA  
ATAGGAGGACCTTGTGCTCTGGCACAGTAGGAGAACTCTCTTTCTCTGCTTGAAGGACAGACATGACTTTCCGAAATTTCCCCAGGAGGATTTGA

A  
H  
I  
J  
C

300  
-GGCAACCAGTTCCAAAAGGCTGAAACCATCCCTGTCTCCATGAGATGATCCAGCAGATCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGG  
TGGCAACCAGTTCCAAAAGGCTCAAGCCATCTCTGCTCCATGAGATGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGG  
TGGCAACCAGTTCCAAAAGGCTCAAGCCATCTCTGCTCCATGAGATGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGG  
TGGCAACCAGTTCCAAAAGGCTCAAGCCATCTCTGCTCCATGAGATGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGG  
TGGCAACCAGTTCCAAAAGGCTCAAGCCATCTCTGCTCCATGAGATGATCCAGCAGACCTTCAATCTCTTCAGCACAAAGGACTCATCTGCTGCTTGG

A  
H  
I  
J  
C

400  
GATGAGACCTCTAGACAAATCTACACTGAACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGTTGGGGTGCAGAGACTCCCC  
GATGAGACCTCTAGACAAATCTACACTGAACTCTACCAGCAGCTGAATGACCTGGAAGCCTGTGTGATACAGGGGTTGGGGTGCAGAGACTCCCC  
GAAACAGAGCTCTAGAAAAATTTCCACTGAACTTTACCAGCAACTGAATAACCTGGAAGCATGTGTATACAGGAGGTTGGGATGGAAGAGACTCCCC  
GAAACAGAGCTCTAGAAAAATTTCCACTGAACTTTACCAGCAACTGAATGACCTGGAAGCATGTGTATACAGGAGGTTGGGGTGCAGAGACTCCCC  
GAAACAGAGCTCTAGAAAAATTTCCACTGAACTTTACCAGCAACTGAATGACCTGGAAGCATGTGTATACAGGAGGTTGGGGTGCAGAGACTCCCC

A  
H  
I  
J  
C

500  
TGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATCTTCCAAAGAACTCACTCTCTAATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGT  
TGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATCTTCCAAAGAACTCACTCTCTAATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGT  
TGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATCTTCCAAAGAACTCACTCTCTAATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGT  
TGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATCTTCCAAAGAACTCACTCTCTAATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGT  
TGATGAAGGAGGACTCCATTCTGGCTGTGAGGAAATCTTCCAAAGAACTCACTCTCTAATCTGAAAGAGAAGAAATACAGCCCTTGTGCTGGGAGGTTGT

A  
H  
I  
J  
C

600  
CAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTGTCACAAACTTGAAGAAAGTTTAAAGAGTAAAGAAATGAAACTGGTTCAACATGGAATGATTTTCAT  
CAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTTCAACAAACTTGAAGAAAGTTTAAAGAGTAAAGAAATGAAACTGGTTCAACATGGAATGATTTTCAT  
CAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTTCAACAAACTTGAAGAAAGTTTAAAGAGTAAAGAAATGAAACTGGTTCAACATGGAATGATTTTCAT  
CAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTTCAACAAACTTGAAGAAAGTTTAAAGAGTAAAGAAATGAAACTGGTTCAACATGGAATGATTTTCAT  
CAGAGCAGAAATCATGAGATCTTTTCTTTTCAACAAACTTGAAGAAAGTTTAAAGAGTAAAGAAATGAAACTGGTTCAACATGGAATGATTTTCAT

A  
H  
I  
J  
C

700  
TGATTCGTATGCCAGCTCACCTTTTTATGATCTGCCATTTCAAAGACTCATGTTTCTGCTATGACCATGACACGATTTAAATCTTTTCAAATGTTTTTGG  
TGACTAATACATCATCTCACACTTTTCATGAGTCTTCCATTTCAAAGACTCACTTCTATAACCACCACAGTGAATCAAATTTTCAAATGTTTTTGG  
TGACTAATACATCATCTCACACTTTTCATGAGTCTTCCATTTCAAAGACTCACTTCTATAACCACCACAGTGAATCAAATTTTCAAATGTTTTTGG  
TGACTAATACATCATCTCACACTTTTCATGAGTCTTCCATTTCAAAGACTCACTTCTATAACCACCACAGTGAATCAAATTTTCAAATGTTTTTGG  
TGACTAATACATCATCTCACACTTTTCATGAGTCTTCCATTTCAAAGACTCACTTCTATAACCACCACAGTGAATCAAATTTTCAAATGTTTTTGG

A  
H  
I  
J  
C

800  
GAGTATTAATCAACATGATGATGAGCTTTAAGGCACCTAGTCCCTTACAGAGGACCATGCTGACTGATCCATTAATCTATTTAAATATTTTTAAATATTA  
AGGAGTAAAGAGGATCATGATACCTGTGCAGGCACCTAGTCCCTTACAGATGACCATGCTGATGCTCTTTTCATCTATTTATTTAAATATTTATTT  
AGTGTAAAGAGGATCATGATACCTGTGCAGGCACCTAGTCCCTTACAGATGACCATGCTGATGCTCTTTTCATCTATTTATTTAAATATTTATTT  
AGTGTAAAGAGGATCATGATACCTGTGCAGGCACCTAGTCCCTTACAGATGACCATGCTGATGCTCTTTTCATCTATTTATTTAAATATTTATTT  
AGTGTAAAGAGGATCATGATACCTGTGCAGGCACCTAGTCCCTTACAGATGACCATGCTGATGCTCTTTTCATCTATTTATTTAAATATTTATTT

A  
H  
I  
J  
C

900  
TTTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTT  
ATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTT  
ATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTT  
ATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTT  
ATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTT

A  
H  
I  
J  
C

1,000  
TAAATTTATTTGTTGTTGATGAACTTTTGGCTATGGAAGTTTGTACTGTTTATCTTTAAATGAAATTTCCAGCCATAATTTGGAACCTGATTA  
TATATTTATTTGTTGTTGATGAACTTTTGGCTATGGAAGTTTGTACTGTTTATCTTTAAATGAAATTTCCAGCCATAATTTGGAACCTGATTA  
AATTTCTTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTT  
TAAATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTT  
TAAATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTTTAACTATTT