

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) **BG**

(11) **60441 B2**

5(51) C 07 K 15/26

C 12 P 21/00

A 61 K 37/02



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 98456

(22) Заявено на 11.02.94

(24) Начало на действие
на патента от: 11.02.94

Приоритетни данни

(31) (32) (33)

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № на

(45) Отпечатано на 30.06.95

(46) Публикувано в бюлетин № 3
на 15.03.95

(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег.

(73) Патентоприитежател(и):

Biogen, Inc., Cambridge, MA (US)

(72) Изобретател(и):

Walter Charles Fiers, Destelbergen (BE)

(74) Представител по индустриална
собственост:

Румяна Стефанова Слабова,
1000 София, бул. "Васил Левски" 68
вх. 2, ап. 31

(86) № и дата на РСТ заявка:

(87) № и дата на РСТ публикация:

Издава се съгласно § 4 от Преходните и заключителните разпоредби на
Закона за патентите на основание патент US № 57069 издаден на 21.08.92

(54) ДНК ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИ, РЕКОМБИНАНТНИ ДНК МОЛЕКУЛИ И МЕТОДИ ЗА
ПОЛУЧАВАНЕ НА ПЕПТИДИ, ПОДОБНИ НА ЧОВЕШКИ ФИБРОБЛАСТЕН ИНТЕРФЕРОН

(57) Изобретението се отнася до ДНК последователности, рекомбинантни ДНК молекули и методи
за получаване на полипептиди, които са сродни с човешкия фибробластен интерферон. По-специално
изобретението се отнася до ДНК секвенции за интерферони, експресирани в подходящ госто-
приемник.

25 претенции, 13 фигури

BG60441 B2

(54) ДНК ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТИ, РЕКОМБИНАНТНИ ДНК
МОЛЕКУЛИ И МЕТОДИ ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА
ПЕПТИДИ, ПОДОБНИ НА ЧОВЕШКИ ФИБРОБЛАСТЕН
ИНТЕРФЕРОН

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Изобретението се отнася до ДНК последователности,
рекомбинантни ДНК молекули и метод за получаване на

полипептиди от рода на човешки фибробластен интерферон. По-специално изобретението се отнася до ДНК последователности, експресирани в подходящ гостоприемник. Рекомбинантната молекула, описана тук, се характеризира с ДНК последователности, кодиращи пептиди, чиито аминокиселинни секвенции и композиция са съществено съвместими с човешки фибробластен интерферон и които имат имунологичната и биологична активност на последния. Както ще проличи от изложеното по-долу, ДНК последователностите, рекомбинантните ДНК молекули и методите на това изобретение могат да се използват за получаване на полипептиди, полезни като антивирусни, антитуморни и антиракови агенти и в други методи.

ХАРАКТЕРИСТИКА НА ПРЕДШЕСТВУВАЩОТО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

Използувана е номенклатура за интерферон публикувана в Nature, 286, p. 2421 (10 юли 1980). Тя замества номенклатурата, публикувана в наши по-ранни изследвания, тъй като новото изобретение претендира за приоритет пред тях. Т. е. IF сега се обозначава IFN, а фибробластен интерферон - IFN-бета.

Известни са два класа интерферони ("IFN"). Интерфероните от клас I са малки, киселинно стабилни (глико)протеини, които правят клетките резистентни към вирусна инфекция (A. Isaacs and J. Lindeman, "Virus interference I. The Interferon", Proc. Royal Soc. Ser. B., 147, pp. 258-67 (1957) and W. E. Stewart, II, The Interferon System, Springer-Verlag (1979)(по-долу "The Interferon System"). Клас II интерфероните са киселинно неустойчиви. Понастоящем те са лошо характери-

зиращи. Въпреки, че в известна степен са клетъчно специфични (The Interferon System), интерфероните не са вирусно специфични. Обратно, те запазват клетките срещу широк спектър вируси.

Човешкият интерферон (Hu IFN) е класифициран в три групи - алфа, бета и гама. HuIFN-бета или фибробластен интерферон се произвежда при подходяща индукция от диплоидни фибробластни клетки. Той също така се произвежда в малки количества в лимфобластоидните клетки, заедно с големи количества човешки интерферон-алфа. IFN-бета произведен от тези клетки е детайлно пречистен и характеризиран (E. Knight, Jr., "Interferon: Purification and Initial Characterisation From Human Diploid Cells", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, pp. 520-23 (1976)). Той е гликопротеин с молекулно тегло около 20000 (M. Wiranowska-Stewart, et. al., "Contributions of Carbohydrate Moieties to the Physical and Biological Properties of Human Leucocyte, Lymphoblastoid and Fibroblast Interferons", Abst. Ann. Meeting Amer. Soc. Microbiol., p. 246 (1978)). Той е също хетерогенен съобразно теглото си, което се дължи на въглехидратните му съставки.

Аминокиселинната композиция на човешки фибробластен интерферон е описана от E. Knight, Jr., et al., "Human Fibroblast Interferon: Amino Acid Analysis and Amino-Terminal Amino Acid Sequence", Science, 207, pp. 525-26 (1980)). Изясняването на аминокиселинната последователност на автентичен човешки фибробластен интерферон е в ход. До днес е изяснена аминокиселинната последователност на NH₂ края на автентичен зрял протеин за първите 13 аминокиселинни остатъка: Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser...(E. Knight, Jr., et al., по-горе).

Известно е, че два различни гена, единият локализиран в хромозома 2, а другият в хромозома 5 кодират интерферон-бета (D. L. Slate and R. H. Ruddle, "Fibroblast Interferon in Man Is Coded by Two Loci on Separate Chromosomes", Cell, 16, pp. 171-80 (1979)). Други изследвания обаче показват, че генът за интерферон-бета се намира върху девета хромозома (A. Medger et al., "Involvement of a Gene on Chromosome 9 in Human Fibroblast Interferon Production", Nature, 280, pp. 493-95 (1979)).

Въпреки че автентичният интерферон-бета е гликозилиран, отстраняването на въглехидратната част (P. J. Bridgen, et al., "Human Lymphoblastoid Interferon", J. Biol. Chem., 252, pp. 6585-87 (1977)) или синтез на интерферон-бета в присъствие на инхибитори, които пречат на гликозилирането (W. E. Stewart, II, et al., "Effect of Glycosylation Inhibitors on the Production and Properties of Human Leucocyte Interferon", Virology, 97, pp. 473-76 (1979); J. Fujisawa et al., "Nonglycosylated Mouse L Cell Interferon Produced by the Action of Tunicamycin", J. Biol. Chem., 253, pp. 8677-79 (1978); E. A. Havel et al., "Altered Molecular Species of Human Interferon Produced in the Presence of Inhibitors of Glycosylation", J. Biol. Chem., 252, pp. 4425-27 (1977); The Interferon System, p. 181) дава по-малка форма от интерферон-бета, който запазва повечето или всички активности на интерферона.

Човешки интерферон-бета, както много човешки протеини може да бъде полиморфен. Следователно клетки или отделни индивиди могат да произвеждат видове интерферон-бета в по-общия клас, които да са физиологично сходни, но структурно леко различни от протеина на класа, към който се числят. Така че, докато протеиновата структура на интерфе-

рон бета общо е добре дефинирана, то някои индивиди могат да произвеждат интерферони, които леко варират от нея.

Интерферон-бета обикновено не се открива в нормални или здрави клетки (The Interferon System, pp. 55-57). Той се произвежда, когато клетката е обект на индуктор на интерферон. Интерфероновите индуктори обикновено са вируси, но могат да бъдат и невирусни по характер, като естествена или синтетична двойноверижна РНК, вътреклетъчни микроби, микробиални продукти и различни химични агенти. Направени са много опити да се извлече полза от тези невирусни индуктори, за да станат човешките клетки резистентни на вирусни инфекции (S. Barons and F. Dianzani (eds.), Texas Reports On Biology And Medicine, 35 ("Texas Reports ")), pp. 528-40 (1977)). Тези опити не са много успешни. Вместо това, сега се предпочита екзогенен интерферон-бета.

Интерфероновата терапия срещу вируси, тумори и рак се провежда с различни режими на дозите и с различни начини на прилагане (The Interferon System, pp.305-321). Например интерферон се прилага успешно орално, чрез инжектиране - интрамускулно, интравенозно, интраназално, интрадермално и подкожно - , също и под формата на очни капки, мехлеми или спрей. Той обикновено се прилага един до три пъти дневно в дози от 10^4 до 10^7 единици. Продължителността на терапията зависи от пациента и условията на лечение. Напр. вирусни инфекции се третират един или два пъти дневно в продължение на няколко дни (до две седмици), един до няколко пъти дневно, повече от няколко месеци или дори години. Най-ефективната терапия за даден пациент трябва да бъде определена от съответен лекар, който да прецени факторите като степен на заболяването, предшестваща

терапия и отговора на пациента към интерферон при избрания начин на приложение и режим на дозировка.

Като антивирусен агент, човешки интерферон се използва за лечение на следното: респираторни инфекции (Texas Reports, pp. 486-496); херпесно-вирусен кератит (Texas Reports, pp.497-500); R. Sundmacher, " Exogenous Interferon in Eye Diseases", *International Virology*, IV, The Hague, Abstract nr. W2/11, p. 99 (1978)); акутен хеморагичен конюнктивит (Texas Reports pp.501-10); аденовирусен кератоконюнктивит (A. Romano *et al.*, ISM Memo I-A8131 (October, 1979)); варицела зостер (Texas Reports pp.511-15); цитомегаловирусна инфекция (Texas Reports, pp.523-27); и хепатит В (Texas Reports, pp.516-22). Виж също и The Interferon System, pp. 307-19. Обаче широкоспектърното използване на интерферона като вирусен агент изисква по-големи количества от него, отколкото са достъпни до този момент.

В прибавка към антивирусното, интерферонът има и други действия. Например той е антагонист на действието на фактора, стимулиращ колонии, инхибира растежа на хемопоезичните, формиращи колонии клетки и повлиява нормалната диференциация на гранулоцитните и макрофагови предшественици (Texas Reports pp.343-49). Той също инхибира еритроидната диференциация в левкемични клетки на Friend, третирани с DMSO (Texas Reports pp.420-28). Отбелязано е, че в това отношение някои клетъчни линии могат да бъдат значително по-чувствителни към интерферон-бета, отколкото към интерферон-алфа (S. Einhorn and H. Strander, "Is Interferon Tissue-Specific? - Effect of Human Leucocyte and Fibroblast Interferons on the Growth of Lymphoblastoid and Osteosarcoma Cell Lines"., J. Gen. Virol., 35, pp. 573-77 (1977)); T.

Kuwata, et al., "Comparison of the Suppression of Cell by Leucocyte and Fibroblast Interferon", J. Gen. Virol., 43, pp. 435-39 (1979)).

Интерферонът може също да играе роля в регулирането на имунния отговор. Например в зависимост от дозата и времето на приложение по отношение на антигена, IFN може да бъде както имуностимулиращ, така и имуносупресиращ *in vivo* и *in vitro* (Texas Reports, pp.357-69). В прибавка, е наблюдавано, че специфично сенсibiliзираните лимфоцити произвеждат интерферон след контакт с антигена. Следователно, такъв антигенно индуциран интерферон може да бъде регулатор на имунния отговор, повлияващ както нивата на циркулиращия антиген, така и изявата на клетъчния имунитет (Texas Reports, pp.370-74). Известно е също, че интерферонът повишава активността на килърните лимфоцити и антиязлозависимата, клетъчно-медирана цитотоксичност (R. R. Herberman, et al., "Augmentation by Interferon of Human Natural and Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity", Nature, 277, pp. 221-23 (1979); P. Beverly and D. Knight, "Killing comes Naturally", Nature, 278, pp. 119-20 (1979); (Texas Reports, pp. 375-80); J. R. Huddlestone, et al., "Induction and Kinetics of Natural Killer Cells in Humans Following Interferon Therapy", Nature, 282, pp 417-19 (1979); S. Einhorn, et al., "Interferon and Spontaneous Cytotoxicity in Man. II. Studies in Patients Receiving Exogenous Leucocyte Interferon", Acta Med. Scand., 204, pp. 477-83 (1978)). И двете могат директно и индиректно да се включат в имунологичната атака върху туморните клетки.

Следователно в допълнение към използването му като анти-вирусен агент, интерферонът има потенциално приложение

при антитуморната и антиракова терапия (The Interferon System, pp. 319-21 и 394-99). Известно е, че интерфероните повлияват растежа на много класове тумори в различни животни (The Interferon System, pp.292-304). Те, както и другите антитуморни агенти, изглеждат най-ефективни, когато са насочени срещу малки тумори. Антитуморното действие на животински интерферон е зависимо от дозировката и времето, но е демонстрирано при концентрации под токсичните нива. Същевременно различни опити са проведени и продължават да се провеждат върху антитуморните и антиракови свойства на човешките интерферони. Те включват лечение на различни злокачествени заболявания като остеосаркома, акутна миелоидна левкемия, мултиплена миелома и болест на Ходжкин ;(Texas Reports , pp. 429-35). В прибавка, скоро е показано , че човешкият интерферон-бета причинява локална туморна регресия, когато е инжектиран в подкожни туморни възли в поразени от меланома или рак на гърдата пациенти (T. Nemoto, et al., "Human Interferons and Intralesional Therapy of Melanoma and Breast Carcinoma", Amer. Assoc. For Cancer Research, Abs. nr. 993, p. 246 (1979)). Въпреки че резултатите от тези клинични тестове са окуражаващи, антитуморното и антираково приложение на интерферон-бета е силно осуетено от липсата на адекватно снабдяване с пречистен интерферон.

Забележително е, че някои клетъчни линии, които са резистентни на антиклетъчното действие на интерферон-алфа, остават чувствителни към интерферон-бета. Това диференцирано действие показва, че интерферон-бета може да бъде успешно използван срещу някои класове резистентни туморни клетки, които се появяват след избиращия

натиск у пациенти, третирани с високи дози интерферон-алфа (Т. Kuwata, et al., по-горе; A. A. Creasy, et al., "The role of G0-G1 Arrestin the Inhibition of Tumor Cell Growth by Interferon", Abstracts, Conference on Regulatory Functions of Interferons, N. Y. Acad. Sci., nr 17 (October 23-26, 1979)).

На биохимично ниво интерфероните индуцират формирането поне на три протеина, протеинкиназа (B. Lebleu et al., "Interferon, Double-Stranded RNA and Protein Phosphorylation", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, pp. 3107-11 (1976); A. G. Hovanessian and I. M. Kerr, "The (2'-5') Oligoadenylate (pppA2'-5A2'-5'A) Synthetase and Protein Kinase(s) From Interferon Treated Cells", Eur. J. Biochem., 93, pp. 512-16 (1979)), (2'-5') олиго (A) полимераза (A. G. Hovanessian et al., "Synthesis of Low Molecular Weight Inhibitor of Protein Synthesis with Enzyme from Interferon-Treated Cells", Nature, 268, pp 537-39 (1977); A. G. Hovanessian and I. M. Kerr, Eur. J. Biochem., по-горе) и фосфодиестераза (A. Schmidt, et al., "An Interferon-Induced Phosphodiesterase Degrading (2'-5') oligoadenylate and the C-C-A Terminus of t RNA", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, pp. 4788-92 (1979)).

Изглежда, че и интерферон-бета, и интерферон-алфа включват сходни ензимни пътища (C. Baglioni, "Interferon-Induced Enzymatic Activities and Their Role in the Antiviral State", Cell, 17, pp. 255-64 (1979)), и двата може би имат сходна активна сърцевина, тъй като разпознават кодирания от 21. хромозома клетъчен рецептор (M. Wiranowska-Stewart, "The Role of Human Chromosome 21 in Sensitivity to Interferons", J. Gen. Virol., 37, pp. 629-34 (1977)). Появяването на един или повече ензими в клетки, третирани с интерферон, би позволило по-ната-

тъшно характеризирани на протеините със сходна на интерферона активност.

Днес, човешкият интерферон-бета се произвежда от човешки клетъчни линии, отглеждани в тъканна култура. Това е скъп процес със нисък добив. Един голям производител получава само $40-50 \times 10^8$ единици груб екстракт интерферон-бета за година (V. G. Edy *et al.*, "Human Interferon: Large Scale Production in Embryo Fibroblast Cultures", in Human Interferon (W. R. Stinebring and P. J. Chapple, eds), Plenum Publishing Corp., pp 55-60 (1978)). Интерферон-бета със специфична активност от 10^6 единици/мг може да се възстанови с 50% добив от груби клетъчни екстракти, като се пречисти чрез адсорбция върху стъклени сфери с контролиран размер на порите (A. Billiau *et al.*, "Human Fibroblast Interferon for Clinical Trials: Production, Partial Purification and Characterization", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, pp. 49-55 (1979)). По-нататъшното пречистване до специфична активност от около 10^9 единици /мг се постига с цинково-хелатна афинитетна хроматография с около 100% добив (A. Billiau *et al.*, "Production, Purification and Properties of Human Fibroblast Interferon", Abstracts, Conference on Regulatory Functions of Interferons, N. Y. Acad. Sci., nr 29 (October 23-26 (1979))). Тъй като специфичната активност на човешкия интерферон-бета е много висока, количеството, необходимо за практическо приложение е ниско. Например 100г чист интерферон-бета биха осигурили между 3 и 30 милиона дози.

Настоящият напредък на молекулярната биология направи възможно включването на ДНК, кодираща небактериални еукариотни протеини в бактериални клетки. Общо, с ДНК, която не е получена чрез химичен синтез, конструирането на

такава рекомбинантна ДНК молекула се състои от следните стъпки: получаване на едноверижно ДНК копие (кДНК) от пречистена матрична РНК (мРНК), която е матрица за желания протеин; превръщане на кДНК в двойноверижна ДНК; свързване на ДНК към подходящ участък на подходящо клониращо средство за получаване на рекомбинантна ДНК молекула и трансформирането ѝ в подходящ гостоприемник. Такава трансформация дава възможност на гостоприемника да произвежда желания протеин. Много небактериални гени и протеини се получават в *E. coli* чрез използване на рекомбинантна ДНК технология. Между тях са интерферон-алфа (S. Nagata, et al., "Synthesis in *E. coli* of a Polypeptide with Human Leucocyte Interferon Activity", Nature, 284, pp 316-20 (1980)). В допълнение рекомбинантната ДНК технология се използва за получаване на плазмид, съдържащ генна последователност, кодираща интерферон-бета (T. Taniguchi et al., "Construction and Identification of a Bacterial Plasmid Containing the Human Fibroblast Interferon Gene Sequence", Proc. Japan Acad. Ser. B, 55, pp. 464-69 (1979)).

Обаче, никъде в миналото не е описана актуалната генна последователност на интерферон-бета и тази последователност не е сравнена с първоначалната аминокиселинна последователност или аминокиселинна композиция на автентичния интерферон-бета. Предната работа е насочена само към интерферон-алфа, който е от клас I и се различава химически, биологически и имунологично от интерферон-бета (вж. по-горе). Последните данни се базират единствено на данните от хибридизацията. Тези данни сами по себе си не могат да определят дали избраният клон съдържа пълната и действаща генна последователност, кодираща интерферон-

бета и дали клонираната генна последователност ще може да експресира интерферон-бета в бактериите. Хибридизацията само потвърждава, че определен ДНК участък е в дадена степен хомоложен и комплементарен със компонент от мРНК от поли-А РНК, която индуцира интерферонна активност, когато е инжектирана в ооцити. Нещо повече, наличието на определена хомоложност е зависимо от условията на хибридизация, избрани при скриниращия процес. Следователно, хибридизацията към мРНК компонент от поли(А) РНК само по себе си не показва, че избраната ДНК секвенция е тази, която кодира интерферон-бета и че тя ще бъде полезна при получаването на този полипептид в подходящ гостоприемник.

На семинар в Цюрих на 25 февруари 1980, Танигучи докладва, че е определил нуклеотидната последователност на един от неговите хибридиращи клонове. Той също установи, че първите 13 аминокиселини, кодирани от тази последователност са идентични с тези, определени от E. Knight, Jr., et al., (по-горе) за автентичния HuIFN-бета. Танигучи не показва пълната нуклеотидна последователност за своя клон, нито сравнява неговата аминокиселинна композиция с тази, определена за автентичен човешки интерферон-бета. Той докладва пълната нуклеотидна последователност на своя хибридиращ клон (T. Taniguchi et al., Gene, 10, pp. 11-15 (1980)). Последователността се различава с един нуклеотид от тази, която е описана и претендираща за патент в British patent application 8011306 от 3 април 1980г., и към което заявление за патент настоящата работа има претенции за приоритет. Аминокиселинната последователност докладвана от Танигучи е описана и с

претенции в предшествуващото заявление. Танигучи също така не докладва за експресия в съответен гостоприемник на полипептидите, които имат биологична и имунологична активност на човешки интерферон-бета по време на попълване на заявлението за британски патент 80.18701 от 6 юни 1980г. към което настоящото заявление също претендира за приоритет. Тази експресия в гостоприемник на полипептид(и), имащи биологична и имунологична активност на човешки интерферон-бета, както и методите, полипептидите, гените и рекомбинантните ДНК молекули свързани с нея, характеризират настоящото изобретение.

Това изобретение не се отнася до приготвяне на чиста или съществено чиста мРНК за интерферон-алфа преди опитите да се клонира генът за интерферон или да се получат пептиди, подобни на фибробластния интерферон в бактериални гостоприемници, както е видно в предложението в Research Disclosure No. 18309, pp. 361-62 (1979).

Най-накрая трябва да се отбележи, че изборът на ДНК последователност или на конструкция от рекомбинантна ДНК молекула, която хибридизира с мРНК от полиА РНК (тази, която произвежда HuIFN активност в ооцити), не е достатъчна да покаже, че ДНК последователността или хибрида, включен в рекомбинантната ДНК молекула, отговарят на човешки интерферон. При отсъствие на сравнение между аминокиселинната последователност, кодирана от определена ДНК секвенция и аминокиселинната последователност на автентичния протеин, само произвеждането на полипептиди, които показват имунологична или биологична активност на човешки интерферон, могат действително да покажат, че избраната ДНК последователност или

конструираната рекомбинантна ДНК молекула отговарят на NuIFN. Нещо по-важно, само след като е показана такава активност на човешки интерферон, ДНК секвенцията, рекомбинантната ДНК молекула или секвенциите сходни с тях могат да бъдат успешно използвани за избор на други секвенции, отговарящи на NuIFN в съответствие с това изобретение или да се получат рекомбинантни ДНК молекули, които експресират продукти, имащи имунологична или биологична активност на човешки интерферон-бета.

Следователно от гореказаното трябва да стане ясно, че проблемът за получаване на човешки интерферон-бета посредством използването на рекомбинантна ДНК технология е по-различен от всеки от по-горе описаните процеси. Тук определена ДНК последователност с непозната структура - кодираща експресията на човешки интерферон-бета в подходящ гостоприемник - може да бъде намерена и отделена от високо-комплексна смес от ДНК секвенции за да се използва за получаване на човешки интерферон-бета. По-нататък този проблем за локализиране и отделяне се изостря от предсказаната извънредно ниска концентрация на желаната ДНК секвенция в комплексната смес и липсата на ефективни средства за бързо анализиране на многото ДНК последователности в сместа за избиране и отделяне на желаната секвенция.

СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

Настоящото изобретение разрешава проблеми, отнасящи се до установяване на мястото и отделяне на ДНК последователности, които кодират експресията на човешки интерферон-бета в подходящ гостоприемник, като при това

осигурява ДНК последователности, рекомбинантни ДНК молекули и методи, чрез които гостоприемника се трансформира в продуциращ бета-тип интерферони.

Въз основа на това изобретение е възможно да се получат бета-тип интерферони за използването им в антивирусни, антитуморни и антиракови агенти и методи. Това изобретение позволява получаването на тези полипептиди в количества и с методи, които не са били достъпни досега.

Както ще се разбере от изложението, което следва, ДНК секвенциите и рекомбинантните ДНК молекули на изобретението са в състояние да направляват произвеждането на бета-тип интерферони в подходящ гостоприемник. Репликацията на тези ДНК секвенции и рекомбинантни ДНК молекули в подходящ гостоприемник също така позволява получаването на големи количества от гени, кодиращи тези полипептиди. Молекулярната структура и свойства на тези полипептиди и гени се определят леко. Полипептидите и гените са полезни както получени в гостоприемника, така и след подходяща дериватизация или видоизменяне, в композиции и методи за определяне или усъвършенстване получаването на тези продукти сами по себе си и за използването им като антивирусни, антитуморни и антиракови агенти и методи.

Този процес е следователно различен от предните процеси, отбелязани по-горе, тъй като той обратно на тях включва приготвянето и избирането на ДНК последователности и рекомбинантни ДНК молекули, които съдържат подходящи ДНК секвенции, кодиращи поне един интерферон от бета-тип.

От гореказаното се приема, че основният аспект на това изобретение е осигуряването на рекомбинантна ДНК молекула, способна да индуцира в едноклетъчен гостоприемник експресията на полипептид, проявяващ имунологична и биологична активност на човешки интерферон от бета-тип, иначе казано ДНК секвенцията да е избрана така че:

(а) ДНК участъците G-pPLa-HFIF-67-12 [HincII-Sau3AI], G-pPLa-HFIF-67-12Δ 19 [HincII-Sau3AI] и G-pPLa-HFIF-67-8 [HincII-Sau3AI], да бъдат носени от микроорганизми, идентифицирани съответно с номера DSM 1851-1854.

(b) ДНК секвенциите да хибридизират с някои от гореспоменатите участъци и

(c) ДНК секвенциите, които са дегенерати в резултат на генетичен код на ДНК участъците и секвенциите, дефинирани в (a) и (b) и които при експресията си кодират полипептиди, имащи същата аминокиселинна последователност, да бъдат свързани към една контролираща експресията последователност в споменатата рекомбинантна ДНК молекула. В частност, ДНК последователността (b), която хибридизира с ДНК участъка (a), може да бъде ДНК участък G-pPLa-HFIF-67-12ΔM1 [BamHI-SauAI], носена от микроорганизъм, дефиниран със съответен номер ATCC 31824 или ДНК участък p[325]-gHIF-4 [EcoRI], носена от микроорганизъм, дефиниран със съответен номер ATCC 31825.

Тези секвенции позволяват получаването на човешки интерферон-бета и подобни нему полипептиди в съответствие с методите на това изобретение.

КРАТКО ОПИСАНИЕ НА ФИГУРИТЕ

Фигура 1 е схематично изображение на една част от методите на изобретението за приготвяне на смес от рекомбинантни ДНК молекули, някои от които се характеризират с включени ДНК последователности, които кодират полипептидите на това изобретение.

Фигура 2 е схематично изображение на процеса на скриниране на първоначалния клон на това изобретение.

Фигура 3 е схематично изображение на една част от процеса на скриниране на клон, използваща ДНК последователност, получена в съответствие с това изобретение.

Фигура 4 представлява съставна нуклеотидна последователност от кодиращата ДНК-верига на човешки интерферон-бета. Последователността е номерирана от началото на участъка до областта, която не се превежда. Нуклеотидите 65-125 представляват сигнална последователност, а нуклеотидите 128-625 представляват "зрял" фибробластен интерферон. Аминокиселинните последователности на сигналния полипептид са изобразени върху съответните им нуклеотидни секвенции; аминокиселините на сигналния полипептид са номерирани от -21 до -1, а аминокиселините на зрелия интерферон - от 1 до 166. Представянето на данните от рестрикционния и фрагментен анализ на ДНК за човешки бета-интерферон, присъстваща в културите депозирани във връзка с заявка за британски патент No 80.11306 от 3. април 1980г. се различава по два нуклеотида във фигура 4, в сравнение с настоящата. Тези промени са в нетранслирана секвенция, която предхожда предложената сигнална секвенция в ДНК на човешки интерферон-бета. Тези промени нямат ефект върху ДНК последователността на човешки интерферон-бета, нито върху аминокиселинната секвенция на

нейния транслационен продукт и не променят използването на последователността като хибридизационна сонда за скриниране на клонове за свързани с HуIFN-beta ДНК инсерти.

Фигура 5 показва ориентационните и рестрикционни карти на някои плазмиди в съответствие с това изобретение.

Фигура 6 е сравнение на аминокиселинната композиция на човешки фибробластен интерферон, определена в съответствие с настоящото изобретение и тази, определена за автентичен фибробластен интерферон.

Фигура 7 показва рестрикционната карта на гена за човешкия фибробластен интерферон на това изследване и стратегията на секвениране, използвана при секвенирането на рHFIF3, рHFIF6 и рHFIF7.

Фигура 8 е схематично изображение на конструкцията на рекомбинантната ДНК молекула рPLa-HFIF-67-1 от това изобретение.

Фигура 9 е схематично изображение на конструкцията на рекомбинантните ДНК молекули рPLa-HFIF-67-12 и рPLa-HFIF-67-12Δ19 от това изобретение.

Фигура 10 е схематично изображение на конструкцията на рекомбинантната ДНК молекула рPLa-HFIF-67-8 от това изобретение.

Фигура 11 е схематично изображение на ориентацията и частична рестрикционна карта на рPLa-HFIF-67-12 от това изобретение.

Фигура 12 е схематично изображение на ориентацията и частична рестрикционна карта на рPLa-HFIF-67-12Δ19 от това изобретение.

Фигура 13 е схематично изображение на ориентацията и частична рестрикционна карта на pPLa-HFIF-67-8 от това изобретение.

НАЙ-ДОБРИЯТ НАЧИН ЗА ПРОВЕЖДАНЕ НА ТОВА ИЗОБРЕТЕНИЕ

За да може даденото изобретение да бъде пълно разбрано е изложено следното детайлно описание.

В описанието се използват следните термини:

Нуклеотид – Мономерна единица от ДНК или РНК, състояща се от захар (пентоза), фосфатен остатък и азотна хетероциклена база. Б е свързана със захарта чрез гликозидна връзка (с 1' въглеродния атом на пентозата) и тази комбинация от база и пентоза се нарича нуклеозид. Базата характеризира нуклеотида. Четирите ДНК бази са аденин ("А"), гуанин ("G"), цитозин ("С") и тимин ("Т"). Четирите бази на РНК са А, G, С и урацил ("U").

ДНК последователност (секвенция) – линейно подредени нуклеотиди, свързани един с друг чрез фосфодиестерни връзки между 3' и 5' въглеродните атоми на съседните пентозни остатъци.

Кодон-ДНК последователност от три нуклеотида (триплет), които кодират чрез мРНК една аминокиселина, сигнал за започване или сигнал за завършване на транслацията. Например нуклеотидните триплети ТТА, TTG, СТТ, СТС, СТА и СТG кодират аминокиселината левцин ("Leu"), TAG, ТАА и TGA са спиращи транслацията сигнали, а АТG е транслационен стартов сигнал.

Рамка на четене – Групирането на кодоните по време на превеждането на м РНК в аминокиселинни секвенции. По

време на транслацията трябва да се следва точната рамка на четене. Например ДНК секвенцията GCTGGTTGTAAG може да се прояви в три рамки на четене или фази, всяка от които дава различна аминокиселинна секвенция:

GCT-GGT-TGT-AAG"Ala-Gly-Cys-Lys

G-CTG-GTT-GTA-AG"Leu-Val-Val

GC-TGG-TTG-TAA-G"Trp-Leu-(Stop)

Полипептид – Линеарно подреждане на аминокиселини, свързани една с друга чрез пептидна връзка между алфа-амино и карбоксилните групи на съседните аминокиселини.

Геном – Цялата ДНК на клетката или вируса. Тя включва *inter alia* структурните гени, кодиращи полипептида на субстанцията, както и оператора, промотора и последователностите за свързване и взаимодействие с рибозомата, включително последователности като на Shine-Dalgarno.

Структурен ген – ДНК последователност, която кодира чрез своята матрична или информационна РНК (мРНК) последователност от аминокиселини, характерна за специфичен полипептид.

Транскрипция (презаписване) – Процесът на получаване на мРНК от структурния ген.

Транслация (превеждане) – Процесът на получаване на полипептид от мРНК.

Експресия – Процесът, на който е подложен структурния ген, за да се получи полипептид. Той е комбинация между транскрипция и транслация.

Плазмид – Нехромозомна двойноверижна ДНК последователност, съдържаща интактен репликон, така че плазмидът се реплицира в клетката на гостоприемника. Когато плазмидът е разположен в едноклетъчен организъм, характеристиките

на този организъм могат да се изменят или трансформират в резултат на ДНК на плазмида. Например плазмид, носещ ген за резистентност към тетрациклин (TetR) трансформира клетка, чувствителна към тетрациклин в резистентна към него. Клетка, трансформирана от плазмид се нарича "трансформант".

Фаг или бактериофаг – бактериален вирус. Много от тях се състоят от ДНК последователност, капсулирана в протеинов плик или обвивка ("капсид").

Клониращо средство – Плазмид, фагова ДНК или друга ДНК последователност, способна да се реплицира в клетка на гостоприемник, характеризираща се с едно или малък брой разпознаващи се от ендонуклеаза места, при които може да бъде срязана по определен начин, без това да е придружено от загуба на есенциална биологична функция на ДНК, т.е. репликация, производство на протеини на обвивката или загуба на промотор и свързващи места, при които ^{свързва} маркер, удобен за разпознаване на трансформираните клетки – например за резистентност към тетрациклин или ампицилин. Клониращото средство често се нарича вектор.

Клониране – Процес на получаване на популация от организми или ДНК последователности, произлизащи от един и същ организъм или секвенция чрез неполова репродукция.

Рекомбинантна ДНК молекула или хибридна ДНК – Молекула, съдържаща сегменти от ДНК от различни геноми, които са свързани по дължина извън живите клетки, имаща способността да инфектира клетки на гостоприемник и да се поддържа вътре.

Последователност, контролираща експресията — Последователност от нуклеотиди, която контролира и регулира експресията на структурни гени, когато е оперативно свързана към тях. Те включват lac системата, главните операторни и промоторни области на фага ламбда, контролната област на fd покривния протеин и други последователности, способни да контролират експресията на гените на прокариотни и еукариотни клетки и тяхните вируси.

Ако сега се върнем към фигура 1, то там е показано схематично изображение на една част от процеса на приготвяне на смес от рекомбинантни ДНК молекули, някои от които включват изрязани ДНК последователности, които характеризират настоящото изобретение.

ПРИГОТВЯНЕ НА ПОЛИ(А)РНК СЪДЪРЖАЩА мРНК ЗА ЧОВЕШКИ ФИБРОБЛАСТЕН ИНТЕРФЕРОН (IFN-beta mRNA)

РНК използвана в това изобретение се екстрахира от човешки VGS клетки, диплоидна фибробластна клетъчна линия, която може да се отглежда в монослойни култури при 37°C. Интерферон-бета се получава в тези клетки при индукция с поли(I,C) в присъствие на циклохексимид.

За типично изолиране на РНК, всяка една от 20 цилиндрични шишета с диплоидни VGS клетки в непрекъснат монослой се подготвя от предния ден със 100 единици/мл интерферон-бета и културите се индуцират за 1 час със 100 мкг/мл поли(I,C) и 50 мкг/мл циклохексимид, инкубират се с циклохексимид (50 мкг/мл) 4 часа, събират се чрез изстъргване във фосфатно-буфериран физиологичен разтвор и се утаяват чрез центрофугиране. Клетките се лизират за 15 мин при 0°C чрез разтваряне в хипотоничен буфер (10 mM Tris-HCL (pH7.4), 10

мМ NaCl и 1.5 мМ MgCl₂) и прибавяне на NP40 до 1% за да се отделят интактните ядра, съдържащи ДНК и да се изолира цитоплазмена РНК. Ядрата се отстраняват чрез утаяване в Sorvall SS-34 ротор за 5 мин при 3000 об/мин. Натриев додецил сулфат ("SDS") и EDTA се прибавят към супернатантата до 1% и 10 мМ съответно и сместа се екстрахира 5 пъти с 2 х обем от 1:1 редестилиран фенол и хлороформ-изоамилов алкохол (25:1). Водната фаза, съдържаща РНК, се отделя чрез центрофугиране в Sorvall SS-34 ротор при 8000 об/мин за 10 мин след всяка екстракция. РНК преципитира из водната фаза чрез прибавяне на 1/10 об. 2М натриев ацетат (рН 5.1) и 2.5 об. етанол. Обикновено за цилиндрично шише се получават 60 - 90 мкг от тоталната РНК.

Използват се също и други процедури за екстрахиране на цитоплазмена РНК. Например клетките се лизират тотално чрез хомогенизиране в 0.2 М Tris-HCl (рН 9.0), 50 mM NaCl, 20 mM EDTA и 0.5% SDS и се екстрахират с фенол-хлороформ както е описано по-горе (F. H. Reynolds *et al.*, "Interferon Activity Produced by Translation of Human Interferon Messenger RNA in Cell-Free Ribosomal Systems and in Xenopus Oocytes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, pp. 4881-87 (1975)) или измитите клетки се суспендират в 400 мкл 0.1 М NaCl, 0.01 М Tris-HCl (рН 7.5), и 0.001 М EDTA ("NTE" буфер) и се прибавят 2.5 мл 4М гуанидин-изотиоцианат и 1М бета-меркаптоетанол в 20 мМ натриев ацетат (рН 5.0) и клетките се хомогенизират. Лизатът се наслоява върху 1.3 мл 5.7 М възглавница от CsCl в нитроцелулозна епруветка Beckman SW-60 Ti, центрофугират се 17 часа при 39000 об/мин, за да се утай РНК и да се отдели от ДНК, белтъците и липидите.

РНК се екстрахира веднъж с фенол-хлороформ (J. Morser, et al., "Characterisation of Interferon Messenger RNA From Human Lymphoblastoid Cells", J. Gen. Virol., 44, pp. 231-34 (1979)).

Тоталната РНК се изследва за присъствие на мРНК за интерферон-бета чрез инжектиране в цитоплазмата на ооцити от *Xenopus laevis* и определяне на индуцираната там активност на интерферон-бета (Reynold et al., по-горе). Изследването се провежда чрез разтваряне на РНК във вода и инжектиране на около 50 μ l във всеки ооцит. Ооцитите се инкубират през нощта при стайна температура в среда на Barth (J. Gurdon, J. Embryol. Exper. Morphol., 20, pp. 401-14 (1968)), хомогенизират се в част от средата, остатъците от клетката се отстраняват чрез центрофугиране и се определя активност на интерферон-бета в супернатантата. Определянето на активността на интерферон-бета става чрез редукция на вирус-индуцирания цитопатичен ефект (W. E. Stewart and S. E. Sulkin "Interferon Production in Hamsters Experimentally Infected with Rabies Virus", Proc.Soc. Exp. Biol. Med., 123, pp. 650-53 (1966)). Инфектиращият вирус е вирус на везикуларен стоматит (линия Indiana), а клетките са човешки диплоидни фибробласти, с тризомия по 21. хромозома, за да се постигне по-висока чувствителност към интерферон-бета. Активността на интерферон-бета се изразява по отношение на реферативен стандарт за интерферон 69/19.

РНК за интерферон-бета, съдържаща поли(А) РНК, се изолира от цитоплазмената РНК чрез адсорбция към олиго(dT)-целулоза (тип 7; P-L Biochemicals) в 0.4 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 10 mM EDTA и 0.2% SDS за 10 мин при стайна температура. Агрегирането на РНК се намалява до минимум чрез загряването ѝ за 2 мин при 70°C преди адсорбцията.

След измиване на целулозата с гореспоменатия буфер, поли(А) РНК фракцията се елюира с 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM EDTA и 0.2% SDS. Тя обикновено съдържа около 4-5% от тоталната РНК, която се измерва при оптична плътност 260 nm.

По-нататъшно пречистване за обогатяване на поли(А) РНК в мРНК за интерферон-бета се постига чрез формаמיד-захарозни градиенти (Т. Pawson *et al.*, "The size of Rous Sarcoma Virus mRNAs Active in Cell-Free Translation", *Nature*, 268, pp. 416-20 (1977)). Тези градиенти имат по-висока разрешителна способност, отколкото неденатуриращите захарни градиенти. Обикновено около 80 мкг поли(А) РНК се разтваря в 50% формаמיד, 100 mM LiCl, 5 mM EDTA, 0.2% SDS и 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), загрява се при 37°C за 2 мин., за да се предотврати агрегирането и се поставя върху 5-20% захарен градиент и се поставя в полиаломерна епруветка Beckman SW-60 Ti. След центрофугиране при 20°C за 4 1/2 часа при 60 000 об/мин. в Beckman SW-60 Ti ротор с тотална, маркирана с ¹⁴C РНК, служеща като маркер за големината, градиентите се фракционират и се определя оптичната плътност на фракциите. Всички РНК фракции се преципитират двукратно с 0.5 M NaCl и 2.5 обема етанол и се изследват за активност на интерферонна мРНК, както е описано по-горе. Процесите на пречистване довеждат до 40-кратно обогатяване на съдържанието на поли(А)РНК в мРНК за интерферон-бета.

Алтернативно, олиго(dT) адсорбираната мРНК (60 мкг) се фракционира чрез електрофореза в 4% полиакриламиден гел в 7 M урея, 0.1% SDS, 50mM Tris-борат (pH 8.3) и 1 mM EDTA. РНК се разтваря в същия буфер и се загрява при 55°C

1 мин. преди да се нанесе върху гела. След електрофорезата се изрязват участъци от гела с ширина 2 мм, РНК се елюира от всеки хомогенизиран участък от гела и се освобождава от онечиствания чрез адсорбция към олиго(dT)целулоза и се изследва за РНК за интерферон-бета както преди.

На това място би трявало да се установи, че поли(А) РНК подукта, получен след формаמיד-захарозните градиенти и фракционирането в полиакриламиден гел, съдържа голям брой различни мРНК. С изключение на мРНК за интерферон-бета, всички останали мРНК са нежелани замърсители (Фигура 1). За съжаление тези замърсители имат сходни отнасяния с мРНК за човешки интерферон по време на останалата част от процеса на клониране в това изобретение. Следователно тяхното присъствие в поли(А) РНК би довело в крайния препарат до голям брой нежелани бактериални клонове, които съдържат гени, кодиращи полипептиди различни от интерферон-бета. Тези замърсявания поставят сложни проблеми пред скрининга при изолирането на желаните интерферон-бета хибридни клонове. В случая с интерферон-бета проблемът на скринирането се задълбочава по-нататък с липсата на достатъчно пречистена проба от мРНК за човешки интерферон-бета или ДНК за него, за да служи като скринираща сонда за идентифициране на желаните клонове. Следователно, скриниращият процес за клоновете за интерферон-бета е много труден и изискващ време. По-нататък, тъй като се очаква много малък процент от клоновете за интерферон-бета да го експресират в биологично и имунологично активна форма, изолирането на активен клон е като "да се търси игла в купа сено".

С предимство можем да използваме рекомбинантна ДНК технология за осигуряване на пречистена проба от мРНК за човешки интерферон-бета или кДНК или част от тях. Тази пречистена мРНК или кДНК може след това да се използва за скриниране на голям брой бактериални клонове и следователно забележително повишава вероятността от изолиране на клон, който експресира интерферон-бета в активна форма.

СИНТЕЗ НА ДВОЙНОВЕРИЖНА кДНК, СЪДЪРЖАЩА кДНК ЗА БЕТА-ИНТЕРФЕРОН

Поли(А) РНК, обогатена в мРНК за интерферон-бета се използва като матрица за приготвяне на комплементарна ДНК ("кДНК"), изключително както е описано от R. Devos et al., "Construction and Characterization of a Plasmid Containing a Nearly Full-Size DNA Copy of Bacteriophage MS2 RNA", J. Mol. Biol., 128, pp. 595-619 (1979) за конструиране на плазмид, съдържащ ДНК копие на РНК от бактериофаг MS2.

Едноверижна кДНК се получава от поли(А) РНК чрез РНК-зависима ДНК-полимераза (25 единици) от птичи миелобластозен вирус ("AMV") обратна транскриптаза (дар от Dr. J. Beard, Life Sciences, Gulfport, Florida), иницирана с (dT) праймер (6 мкг Miles) хибридиизирана към поли(А) опашка на РНК, в 50 мкл 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 10 mM MgCl₂, 30 mM бета-меркаптоетанол, 4mM Na₄P₂O₇, 2.5 мкг/мл инактивиран говежди серумен албумин, dTTP, dATP, dCTP и dGTP всеки с концентрация 0.5 mM и алфа ³²P-dATP (20 микро Ci/ мкл, Amersham). След 30 мин. при 41°C реакцията се спира с прибавяне на EDTA до 10 mM, реакционната смес се екс-

трахира с еднакъв обем фенол-хлороформ-изоамилов алкохол (25:24:1) и водната фаза се наслоява върху колона със Sephadex G-50 и се елюира с ТЕ буфер (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA). Изходните фракции, които показват радиоактивност се преципитират с прибавяне на 10 мкг трансферна РНК от E.coli, калиев ацетат (pH 5.1) до 0.2 M и 2.5 обема етанол.

кДНК популацията, синтезирана по-горе, е всъщност комплексна смес от кДНК, произлизащи от различни мРНК, присъстващи в обогатената поли(А) м РНК (Фиг.1). В добавка, поради предварителното завършване чрез AMV обратна транскриптаза, много от кДНК са непълни копия на различни мРНК в поли(А) РНК (не е показано на Фиг.1).

Преди превръщането на кДНК в двойноверижна, тя се отстранява от асоциирането към комплементарната матрица РНК чрез преципитиране в етанол и инкубиране в ТЕ буфер (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM EDTA) с рибонуклеаза T₁ (10 единици, Sankyo Co., Ltd.) и панкреатична рибонуклеаза А (10 мкг, Sigma) към 10 мкл за 30 мин при 37°C (рибонуклеазите не съдържат едноверижно-специфични ендо- и екзо-дезоксирибонуклеази). Отстраняването на матричната верига с рибонуклеаза вместо с алкали избягва възможната мутация на кДНК чрез алкално-катализирано дезаминиране.

кДНК може да се превърне в двойноверижна чрез ДНК полимераза I (A. Efstratiadis, et al., "Enzymatic In Vitro Synthesis of Globin Genes, Cell, 7, pp. 279-88 (1976)). 10 мкл смес рибонуклеаза/кДНК (от по-горе) се разрежда до 20 мкл с MgCl₂ до 10mM, DTT до 10 mM, калиев фосфат (pH 6.9) до 100mM, dTTP, dATP, dCTP и dGTP всеки с концентрация 0.3 mM и алфа ³²P-dATP (20 micro Ci/ мкл, Amersham) и ДНК

полимераза I (40 единици, Biolabs). След 6 часа при 15°C се прибавят EDTA до 10 mM и SDS до 0.1% и двойноверижната кДНК се изолира чрез екстракция (фенол:хлороформ:изоамилов алкохол), хроматография (Sephadex G50) и преципитиране на изтичащите фракции, както е описано по-горе. За отваряне на двойноверижните фуркетни бримки, които остават върху структурирана на двойноверижната кДНК, преципитираната кДНК се разтваря в 100 мкл 0.2 M NaCl, 50 mM натриев ацетат (pH 4.5), 10 mM цинков ацетат и 2 мкг топлинно денатурирана ДНК от телешки тимус и се третират с S1 нуклеаза (5 единици, Sigma) за 30 мин при 37°C. Прибавянето на EDTA до 10 mM, екстракцията с фенол:хлороформ:изоамилов алкохол и преципитирането на водната фаза чрез прибавяне на 10 мкг трансферна РНК от *E.coli* като носител, калиев ацетат (pH 5.1) до 0.2 M и 2.5 обема етанол дава смес от двойноверижни кДНК с тъпи краища. Тази смес е хетерогенна поради хетерогенността на поли(А)РНК, която е използвана като матрица за получаването ѝ (Фиг.1) и поради предварителното завършване на кДНК транскрипта чрез AMV обратна транскриптаза (не е показано на Фиг.1).

За да се намали ефекта от по-нататъшна хетерогенност, двойноверижната кДНК се оразмерява чрез електрофореза в 4% полиакриламиден гел в 50 mM Tris-боратен буфер (pH 8.3) и 1 mM EDTA. 5'-32P-белязани рестрикционни фрагменти (фХ174 (RF)-ДНК) служат като маркери за големината. Подбират се ДНК фрагменти с подходящ размер (т.е. класовете 800-900 bp, 700-800bp, 650-700bp и 550-650 bp). Тъй като кДНК, получена чрез полиакриламидна електрофореза на поли(А)РНК, показва изразена линия при около 850 bp,

приема се, че тази лента представлява ДНК с пълна дължина. Лентите се елюират чрез разбъркване на гела в 0.5 М амониев ацетат и 0.1% SDS и разбъркване до другия ден. След това отпадъците се отделят чрез центрофугиране, ДНК се адсорбира с хидроксилапатитен прах, наслоява се върху колона Sephadex G50 в 5 mM натриев фосфат (pH 7.5), измива се обилно с буфер и се елюира с 0.45M натриев фосфат (pH 7.5). Веднага се обезсолява чрез ситовия ефект на матрикса на Sephadex G50. Фракциите, съдържащи елюираната ДНК, монитрирани чрез ^{32}P радиоактивност се преципитират чрез прибавяне на 10 мкг трансферна РНК от E.coli като носител, калиев ацетат (pH 5.1) до 0.2 M и 2.5 обема етанол.

Ефективността на добиването на кДНК, описано по-горе се илюстрира чрез типичен експеримент, където около 2 мкг поли(А)РНК след преминаване през формаид-захарен градиент дава около 16 нг двойноверижна кДНК с размер 800-900 bp.

Също така трябва да се отбележи, че тази двойноверижна кДНК е смес от голям брой кДНК, много малко от които са кДНК за интерферон-бета (Фигура 1).

КЛОНИРАНЕ НА ДВОЙНОВЕРИЖНА ДНК

За клониране на двойноверижна кДНК съгласно с това изобретение могат да се приготвят различни комбинации от гостоприемник и клониращо средство. Например полезно клониращо средство може да се състои от сегменти от хромозомни, нехромозомни и синтетични ДНК последователности като различни познати производни на SV40 и познати бактериални плаزمиди, напр. плазмиди от E.coli вкл. col E1, pCR1, pBR322, pMB9 и техни производни, плазмиди с по-широк

обхват на гостоприемника "RP 4, фагови ДНК, като различни производни на фаг ламбда (NM 989) и други ДНК фаги (M13), филаментозни едноверижни ДНК фаги и вектори, произлизащи от комбинации от плазмиди и фагови ДНК, като плазмидите, които са модифицирани да използват фагова ДНК или други контролиращи експресията секвенции или дрождеви плазмиди като 2 μ плазмид или техни производни. Използуваните гостоприемници могат да включват бактериални такива като E.coli HB 101, E.coli x 1776, E.coli x2282, E.coli MRCI и щамове от *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus* и други бацили, дрожди или други гъби, животински и растителни гостоприемници като животински (вкл. човек) и растителни клетки в култура или други гостоприемници. Разбира се не всички комбинации гостоприемник/вектор са еднакво ефективни. Специален подбор от комбинации гостоприемник/клонирателно средство могат да се направят от специалисти след преосмисляне на принципите, изложени по-нататък, без да се отдалечават от обхвата на настоящото изобретение.

По-нататък, в едно специфично клонирателно средство могат да се подберат различни участъци за включване на двойноверижна ДНК. Тези участъци обикновено се обозначават чрез рестрикционните ендонуклеази, които ги срязват. Например в pBR322, PstI участъкът е локализиран в гена за бета-лактамаза, между нуклеотидните триплети, които кодират аминокиселини 181 и 182 на този протеин. Този участък е първоначално използван от Nagata et al., по-горе при тяхния синтез на полипептиди, проявяващи имунологична и биологична активност на интерферон-алфа. Едно от двете HindII ендонуклеазни места за разпознаване е между

триплетите, кодиращи аминокиселини 101 и 102, и едно от няколкото Taq места е при триплета, кодиращ аминокиселина 45 на бета-лактамазата в рBR322. По сходен начин EcoRI участъкът и PvuII участъкът на този плазмид лежат извън някаква кодираща област. EcoRI мястото се намира между гените, кодиращи резистентност към тетрациклин и ампицилин. Това място е използвано от Taniguchi et al., по-горе в тяхната рекомбинантно-синтетична схема. Тези места се разпознават добре от специалистите в тази област. Естествено се подразбира, че клониращото средство, полезно при настоящото изобретение, не е необходимо да има участъци за рестриктази за включване на избрания ДНК фрагмент. Вместо това то може да бъде прибавено към фрагмент с такива свойства.

Векторът или клониращото средство и по-специално мястото избрано в него, за присъединяване на избрания ДНК фрагмент, за да се получи рекомбинантна молекула, се определя от различни фактори, като броя на местата, възприемащи определен рестрикционен ензим, размера на протеина, който ще се експресира, възприемчивостта на желания протеин към протеолитично разграждане от ензимите на гостоприемника, замърсяване или свързване на протеина, който ще се експресира с протеините на гостоприемника, ако то трудно се отстранява по време на пречистването, експресионни характеристики, като локализацията на стартовия и терминационния кодони по отношение на векторната секвенция и други фактори, които са известни на специалистите. Изборът на вектор и място за включване на определен ген се определя при баланса на тези

фактори, тъй като те не са от еднакво значение за даден случай.

Въпреки многото методи, познати в областта на включване на чужда ДНК в клониращо средство или вектор за да се формира рекомбинантна ДНК молекула, методът, избран за първоначално клониране в съответствие с това изобретение е разграждане на плазмид (в частност pBR322) с този рестрикционен ензим, който е специфичен за избрания участък за включване (в частност PstI) и прибавяне на dA опашки към 3' края на терминалната трансфераза. По сходен начин двойно-верижната кДНК се удължава чрез прибавяне на dT опашки към 3' края, за да се улесни присъединяването към опашката на плаزمид. "Опашатият" плазмид и кДНК след това се оставят да ренатурират, за да се включи кДНК към подходящото място в плазмид и да се циркуляризира хибридна ДНК. Комплементарният характер на опашките позволява тяхното сцепление (Фигура 1). Получената рекомбинантна ДНК молекула сега носи вмъкнат ген при избраното PstI рестрикционно място (Фигура 1). Този метод на прикачване на dA-dT краища за включване е описан от D. A. Jackson, et al., "Biochemical Methods for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, pp. 2904-909 (1972) и R. Devos et al., по-горе. Той довежда до 3 пъти повече рекомбинантни ДНК плаزمиди, отколкото прикачването на dC-dG краища.

Разбира се, други познати методи за вмъкване на ДНК секвенции в клониращи средства за получаване на рекомбинантни ДНК молекули са също полезни в настоя-

щото изобретение. Те включват например прикачване на dC-dG краища, директно лигиране, синтетични линкери, репариращи реакции с екзонуклеази и полимерази, последвани от лигиране или разтягане на ДНК веригата с ДНК полимераза и подходяща едноверижна матрица се лигира.

Трябва да се разбере, че нуклеотидната последователност или фрагмента от кДНК, включен в избраното място на клониращото средство, може да включва нуклеотиди, които не са част от истинския структурен ген за желания полипептид или може да включва само фрагмента на пълния структурен ген за него. Изисква се само при каквато ѝ да е включена ДНК, трансформираният гостоприемник да произвежда полипептид, имащ имунологична и биологична активност на човешки интерферон-бета или тази ДНК последователност сама по себе си да се използва като хибридизационна сонда за подбиране на клонове, които съдържат ДНК секвенции, полезни при получаването на полипептиди, имащи имунологична или биологична активност на човешки интерферон-бета.

Клониращото средство или вектор, съдържащ чуждия ген, се използва за трансформиране на гостоприемника, така че да му даде възможност да експресира полипептиди, имащи имунологична или биологична активност на човешки интерферон-бета, които хибридният ген кодира. Избирането на подходящ гостоприемник също се контролира от различни фактори, известни на науката. Те включват например съвместимост с избрания вектор, токсичност на протеините, кодирани от хибридният плазмид, лекота на възстановяване на желания протеин, експресионни характеристики, биологична сигурност и разходи. Балансът на тези фактори трябва да се

НАМЕРИ, КАТО СЕ ЗНАЕ, ЧЕ НЕ ВСИЧКИ ГОСТОПРИЕМНИЦИ МОГАТ ДА БЪДАТ ЕДНАКВО ЕФЕКТИВНИ ЗА ЕКСПРЕСИЯ НА КОНКРЕТНА ДНК МОЛЕКУЛА.

В настоящия синтез предпочитано инициално клониращо средство е бактериалният плазмид pBR322, а предпочитаното инициално място за ендонуклеаза в него е PstI (Фигура 1). Плазмидът е малък (молекулно тегло около 2.6 мегадалтона) и носи гени за резистентност към антибиотиците ампицилин (Amp) и тетрациклин (Tet). Плазмидът е напълно охарактеризиран (F. Bolivar et al., "Construction and Characterization of New Cloning Vehicles II. A Multipurpose Cloning System", Gene, pp. 95-113 (1977); J. G. Sutcliffe, "pBR322 Restriction Map Derived from the DNA Sequence: Accurate DNA Size Markers up to 4361 Nucleotide Pairs Long", Nucleic Acid Research, 5, pp. 2721-28 (1978); J. G. Sutcliffe, "Complete Nucleotide Sequence of the Escherichia coli Plasmid pBR322", Cold Spring Harbor Symposium, 43, I, pp. 77-90 (1978)). Вмъкването на ДНК продукта на тези места осигурява голям брой бактериални клонове, всеки от които съдържа един от ДНК гените или фрагменти от тях, присъстващи в кДНК продукта, приготвен предварително. Отново много малко от тези клонове съдържат гени за интерферон-бета или фрагменти от тях (Фигура 1) и може никой от тях да не експресира полипептиди, проявяващи имунологична и биологична активност на интерферон-бета. Предпочитаният инициален гостоприемник в съответствие с това изобретение е E.coli HB 101.

1. Получаване на dA-удължен, разграден с PstI pBR322

Плазмидът pBR322 се смила напълно при 37°C с PstI ендонуклеаза (New England Biolabs) в 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 7 mM MgCl₂, 7 mM 2- меркаптоетанол. Сместа се

екстрахира с 1 обем фенол и 10 обема етер и се преципитира с 2.5 обема етанол:0.2 М разтвор на натриев ацетат.

Прибавянето на хомополимерни dA краища (опашки)(Фигура 1) чрез терминална дезоксинуклеотидил трансфераза (TdT) (пречистена по L. Chang и F. G. Bollum, "Deoxynucleotide-Polymerizing Enzymes of Calf Thymus Gland", *J. Biol. Chem.*, 246, pp. 909-16 (1971)) се съдържа в 50 мкл реакционен обем, съдържащ 0.14 М калиев какодилат, 30 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1 mM CoSO₄, 0.2 мкг/мл топлинно инактивиран говежди серумен албумин, 0.8 mM DTT, 0.2 mM dATP и малко алфа-³²P dATP. Инкубира се при 37°C за пет минути и после се прибавя EDTA до 10 mM и SDS до 0.1% и сместа се екстрахира с фенол и се хроматографира върху Sephadex G50 в TE буфер. Изтичащите фракции, съдържащи линейризиран и удължен pBR322 се пречистват по-нататък чрез адсорбция към олиго(dT) целулоза в 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM EDTA и 0.4 M NaCl. След продължително измиване желаните фракции се елюират с 10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 1 mM EDTA.

2. Получаване на dT удължена ДНК

Двойноверижна ДНК се удължава с dTMP остатъци по начин, сходен на този, който е описан по-горе за удължаването на pBR322 с dA, с изключение на това, че dTTT и малко ³H-dTTP заместват dATP и алфа-³²P dATP. Пречистването върху олиго(dT) целулоза естествено се пропуска. Както преди dT-удължената ДНК е смес от различни видове, много малко от които са родствени на човешки интерферон-бета (Фигура 1).

3. Получаване на Ca⁺⁺-третирана E.coli HB101

Ca⁺⁺-третирана E.coli HB101 се получава по метода на E. M. Lederberg и S. N. Cohen, "Transformation of Salmonella Typhimurium by Plasmid Deoxyribonucleic Acid", J. Bacteriol., 119, pp. 1072-74 (1974) чрез инокулиране на Escherichia coli HB101 (подарък от H. Boyer) в 5 мл. LB среда (10 части бактотриптон, 5 части дрождев екстракт и 5 части NaCl за литър) и културите се оставят при 37°C до следващия ден. Пресните култури се разреждат 1/100 в 20 мл LB среда и се култивират до плътност около 2×10^8 бактерии/мл, бързо се охлаждат върху лед и се утаяват при 6000 об./мин за 5 мин в Sorvall SS34 ротор при 4°C. Клетките се поддържат при 0-4°C, и се измиват с 20 мл 10мМ CaCl₂. След 20 мин върху лед клетките се утаяват отново и ресуспендират в 2 мл 100мМ CaCl₂ и се държат при 0°C 15 мин. Порции (200 мкл), с добавен глицерол до 11%, могат да се съхраняват няколко месеца при -80°C без да загубят активността си (D. A. Morrison, "Transformation in Escherichia coli: Cryogenic Preservation of Competent Cells", J. Bacteriol., 132, pp. 349-51 (1977)).

4. Ренатуриране на dA удължен pBR322 и dT удължена ДНК
dA и dT краищата на вектора и ДНК инсерта позволяват ренатуриране, което формира първоначално желания хибриден плазмид или рекомбинантна ДНК молекула. За тази цел PstI третирания, снабден с dA краища pBR322 вектор и сместа от оразмерени dT-опашати кДНК се разтварят в TSE буфер (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA и 100 mM NaCl) до 1.5 мкг/мл плазмид и до моларно съотношение на

плазмида към ДНК инсера 1.5:2.0. След 10 минути загряване при 65°C, сместа се охлажда бавно до стайна температура повече от 4 часа.

Продуктът е широка смес от различни рекомбинантни ДНК молекули и някои клониращи средства без включени ДНК последователности. Обаче всяка рекомбинантна ДНК молекула съдържа кДНК сегмент при PstI мястото. Всеки такъв ДНК сегмент може да съдържа ген или фрагмент от него. Много малко от кДНК фрагментите кодират човешки интерферон-бета или част от него (Фигура 1). Непотребната по-голяма част кодира един от останалите протеини или фрагменти от тях, чиито мРНК са част от поли(А)РНК, използвана в процеса на това изследване (Фигура1). Би трябвало да се подразбира, че може и някой от клоновете на така приготвената библиотека да не експресира полипептиди, имащи биологична и имунологична активност на интерферон-бета.

5. Трансфекция на E.coli HB101 с ренатурираните хибридни плазмиди.

За трансфекционния процес е необходимо да се използва Р3 ниво на обезопасяване, а също и за всички по-нататъшни етапи, в които се съхраняват и използват трансформираните бактерии. Проби (90 мкл или по-малко) от горната смес се охлаждаат до 0°C и се прибавя 1 М CaCl₂ до 0.1 М. Количества (100 мкл или по-малко) от този разтвор се прибавя към 200 мкл E.coli HB101, третирана с Ca⁺⁺ в лед и след 30 минути престояване при 0°C, клетките се подлагат на топлинен шок за 5 мин при 37°C и отново се охлаждаат при 0°C за 15 мин. След прибавянето на 2 мл LB среда, клетките се инкубират при 37°C във водна баня с разклащане 30 до 45

мин и бактериалната суспензия се посява върху петрита с 1.2% агар, съдържащ LB среда, снабдена с 10 мкг/мл тетрациклин.

Тъй като плазмид рBR322 включва ген за резистентност към тетрациклин, гостоприемниците *E.coli*, които са трансформирани с плазмид, имащ този ген в интактен вид, ще растат върху културата, съдържаща антибиотика, а нетрансформираниите бактерии ще се изключат. Следователно, растежа в тетрациклин-съдържаща култура дава възможност за селекция на гостоприемниците, трансформирани с рекомбинантна ДНК молекула или рециклиран вектор.

След 24 часа при 37°C, индивидуални колонии се подбират и се разтварят в 100 мкл LB среда (с прибавки както по-горе) в кладенчетата на микротитърна плака (Dynatech). След инкубиране до следващия ден при 37°C, 11 мкл диметилсулфоксид (DMSO) се смесват във всяко кладенче и плаките се запечатват с прилепваща лента. Те се съхраняват при -20°C и се приготвя библиотека от 17 000 индивидуални клона *E. coli* HB101. Тази библиотека произхожда от 270 fmol (128 нг) dT опашати кДНК инсерти, които от своя страна са синтезирани от 4.4 мкг градиентно пречистена поли(А)РНК. Около 98% от клоновете в тази библиотека се чувствителни към карбеницилин (по-стабилно производно на ампицилина). Следователно повече от 98% от библиотеката съдържат плазмид, имащ инсерт при Pst мястото на бета-лактамазния ген на рBR322 и само 2% съдържат рециркулиран вектор без инсерт.

Тези 17 000 клона съдържат множество рекомбинантни ДНК молекули, представляващи пълни или частични копия на сместа от мРНК в поли(А)РНК препарат от човешки интер-

ферон-бета-продуциращи клетки (Фигура 2). Множеството от тях съдържат само единични, рекомбинантни ДНК молекули. Много малко от тези рекомбинантни ДНК молекули са родствени на човешки интерферон-бета. Съответно клоновете трябва да се скринират, за да се отделят свързаните с човешки интерферон-бета клонове от останалите.

СКРИНИРАНЕ НА КЛОН СЪДЪРЖАЩ КДНК ЗА ЧОВЕШКИ ИНТЕРФЕРОН-БЕТА

Съществуват няколко начина за скриниране на бактериални клонове, съдържащи кДНК за човешки интерферон-бета. Те включват например РНК селекционна хибридизация (Alwine et al., по-долу), диференциална хибридизация (T. P. St. John and R. W. Dawis, "Isolation of Galactose-Inducible DNA Sequences from *Saccharomyces Cerevisiae* by Differential Plaque Filter Hybridization", Cell, 16, pp. 443-452 (1979)); хибридизиране със синтетична сонда (B. Noyes et al., "Detection and Partial Sequence Analysis of Gastrin mRNA by Using an Oligodeoxynucleotide Probe", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, pp. 1770-74 (1979)) или скриниране за клонове, които произвеждат желаня протеин чрез имунологични (L. Villa-Komaroff, et al., "A Bacterial Clone Synthesizing Proinsulin", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, pp. 3727-31 (1978)) или биологични (A. C. Y. Chang, et al., "Phenotypic Expression in *E.coli* of a DNA Sequence Coding for Mouse Dihydrofolate Reductase", Nature, 275, pp. 617-24 (1978)) изследвания. Ние избрахме РНК селекционното хибридизиране като най-удобен и надежден метод за първично скриниране.

А. Изследване на РНК чрез селекционно хибридиране

1. Обзор на първоначалното изследване

Разглеждайки Фигура 2, се вижда, че рекомбинантните ДНК молекули се изолират от индивидуални култури от около 46 клона, чувствителни към карбеницилин и резистентни към тетрациклин от описаната по-горе библиотека от клонове (2 смеси от 2 клона са показани на Фиг.2)(етап А). Рекомбинантните ДНК молекули се разграждат и хибридизират към тотална РНК, съдържаща мРНК за човешки интерферон-бета, получени както е описано преди (етап В). Всички хибриди между рекомбинантни РНК молекули и тотална РНК се отделят от нехибридизиралата тотална РНК (етап С). Хибридизиралата тотална РНК се възстановява из хибридите и се пречиства (етап D). Въстановената РНК се изследва за човешки интерферон-бета-РНК активност както е описано по-горе (етап Е). Ако, и само ако сместа от рекомбинантни ДНК молекули съдържа рекомбинантна ДНК молекула, имаща вмъкната нуклеотидна последователност, способна да хибридизира с мРНК за човешки интерферон-бета в тоталната РНК при строги хибридизационни условия, освободената от този хибрид мРНК ще предизвика образуване на човешки интерферон-бета в ооцити, тъй като мРНК, освободена от всеки друг хибрид между рекомбинантна ДНК молекула и тотална РНК, няма да бъде сродна на тази за интерферон-бета. Ако групата от 46 клона дава положителен отговор, клоновете се разделят в 6 подгрупи (4 подгрупи от 8 и 2 подгрупи от 7) и всяка подгрупа се изследва както преди. Процесът продължава, докато се идентифицира само един клон.

Няма осигуровка, че рекомбинантните ДНК молекули и бактериалните клонове, трансформирани с тях и идентифицирани по този начин, съдържат пълната кДНК последователност за интерферон-бета и дори, че кДНК последователността действително кодира интерферон-бета или дава клон, експресиращ полипептиди, имащи имунологична или биологична активност на интерферон-бета. Обаче рекомбинантната ДНК молекула наистина ще съдържа екстензивни нуклеотидни последователности, комплементарни на интерферон-бета мРНК кодиращата секвенция. Следователно, рекомбинантната ДНК молекула поне ще се използва като източник на сонди за бързо скриниране на други рекомбинантни ДНК молекули и клонове, трансформирани с тях, за идентифициране на други партии клонове, които могат да съдържат автентична или пълна нуклеотидна секвенция, кодираща интерферон-бета. Тези клонове могат по-нататък да се анализират за възможна експресия на полипептиди, проявяващи имунологична и биологична активност на интерферон-бета. И, нуклеотидната последователност на включения ДНК фрагмент от тези хибридни плазмиди и нейният аминокиселинен преводен продукт могат да се определят и ако е възможно да корелират с аминокиселинната композиция и инициална секвенция, докладвана за автентичен интерферон-бета (вж. по-горе).

2. Изпълнение на първоначалното изследване

Етап А` – Приготвяне на смес от рекомбинантни ДНК молекули.

Върху петрита с LB агар се правят реплики на микротитърните плаки, съдържащи по 96 клона от гореспоменатата библиотека от клонове, като едната съдържа 10 мкг/мл тетрациклин а другата 100 мкг/мл карбеницилин. По този начин, две партиди от около 45-46 клона, резистентни към тетрациклин и чувствителни към карбеницилин, се взимат и отглеждат поотделно до следващия ден при 37°C в 100 мл LB среда, съдържаща 10 мкг/мл тетрациклин. Тези култури се събират, утаяват се в Sorvall GS-3 ротор при 8000 об/мин за 10 мин, измиват се двукратно с TES буфер (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA, 5 mM NaCl) и се ресуспендират в 40 мл TES за 1 от началния обем на културата. Клетките се лизират с лизозим-Тритон X-100 (M. Kahn *et al.*, "Plasmid Cloning Vehicles Derived from Plasmids Col, El, F, R6K и RK2" in *Methods in Enzymology*, 68: Recombinant DNA (R. Wu, ed.)(1980)). 40 мл от разтворените в TES клетки се обединяват с 20 мл 10% захароза в 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) и лизозим до 1.3 мг/мл и се оставят при стайна температура 20 мин. Към тази суспензия се прибавя 1 мл 0.5 M EDTA-NaOH (pH 8.0), 8 мл Тритон X-100, 25 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) и лизисът се извършва при стайна температура за 30 мин. Остатъците от клетките и по-голямата част от хромозомалната ДНК се отстранява чрез утаяване в Beckman SW27 ротор при 24 000 об/мин за 45 минути. Супернатантата се охлажда върху лед, обединява се с 1/3 обем 40% полиетиленгликол 6000-2 M NaCl и се оставя при 0°C до следващия ден. Полученият преципитат се събира в Sorvall HB4 ротор при 5000 об/мин за 10 мин при 4°C и се разтваря в TES буфер. Разтворът, съдържащ 0.2 об. 10 мг/мл етидиум

бромид (Serva) и CsCl до 1 г/мл се центрофугира в Beckman R60 Ti-ротор при 40 000 об/мин. поне 48 часа. Една полиаломерна гилза обикновено е достатъчна за лизат от 1-2 л. от оригиналния обем на културата. При UV-осветяване в гилзата би трябвало да се визуализират две ДНК ленти. Лентата с по-висока плътност отговаря на форма I плазмидна ДНК, втората лента отговаря на форми 2 и 3 плазмидна ДНК и на някаква хромозомна ДНК. Първата лента се събира, етидиум бромидът се отстранява с шест екстракции с изоамилов алкохол и водната фаза се разтваря с 3 обема доведен с вода до 0.2 М натриев ацетат (pH 5.1) преди ДНК да се преципитира с 2.5 обема етанол. ДНК се разтваря отново, екстрахира се с фенол и отново се преципитира с етанол. Качеството на ДНК се монитрира чрез електрофореза в 1% агарозен гел в 40 mM Tris-HOAc (pH 7.8), 20 mM натриев ацетат, 2 mM EDTA, последвана от оцветяване с етидиум бромид. Ако ДНК е замърсена с много РНК, тя се пречиства по-нататък чрез центрофугиране в неутрален захарозен градиент: 300 мкг ДНК в 10 mM Tris-HCl (pH 7.6) и 1 mM EDTA се наслояват върху 36 мл 5-20% захарозен градиент в 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 1 M NaCl, центрофугират се в полиаломерни епруветки 16 часа при 24 000 об/мин. в Beckman SW27 ротор при 18°C и фракциите, съдържащи ДНК (OD₂₆₀) се събират и преципитират с натриев ацетат-етанол.

Етап В - Хибридизиране на ДНК с тотална РНК

Около 150 мкг така приготвена ДНК се обединява с малко еднакво белязана ³²P ДНК и 2 мкг рSTNV-1 ДНК (рекомбинантен плазмид, съдържащ пълен размер кДНК копие на

PHK от сателитен некротизиращ тютюна вирус ("STNV"); J. Van Emmelo, et al., "Construction and Characterization of a Plasmid Containing a Nearly Full Size DNA Copy of Satellite Tobacco Necrosis Virus RNA", J. Mol. Biol., (in press), като вътрешен контрол, разрушава се с ултразвук в MSE ултразвуков уред и се преципитира с натриев ацетат-етанол.

Твърд матрикс от диазобензил-хидроксиметил (DBM) целулоза (Cf., J. C. Alwine, et al., "Method for Detection of Specific RNAs in Agarose Gels by Transfer to Diazobenzyl Oxymethyl Paper and Hybridizing with DNA Probes", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, pp. 5350-54 (1977)) се приготвя по метода на J. C. Alwine, et al., "Detection of Specific RNAs or Specific Fragments of DNA Fractionation in Cells and Transfer to Diazobenzyl Oxymethyl Paper" Methods in Enzymology, 68: Recombinant DNA (R. Wu, ed.) (1980)). За хартиен матрикс, лист хартия Whatman 540 се намокря равномерно в разтвор, съдържащ 2-3 мг 1-(m-нитробензилокси)метил пиридин хлорид (NBPC/BDH) и 0.7 мл натриев ацетат трихидрат в 28.5 мкл вода за cm^2 , инкубира се при 60°C докато изсъхне и още 10 минути и се изпича при $130-135^\circ\text{C}$ за 30-40 мин. След неколkokратно измиване с вода (около 20 мин), 3 пъти с ацетон (около 20 мин), и изсушаване филтърът се запазва. Хартията се инкубира при 60°C за 30 мин в 0.4 мл 20% натриев - дитионит-вода за cm^2 с обикновено разклащане. Хартията се измива отново 4 пъти с вода, един път с 30% оцетна киселина за 5 мин и четири пъти с вода и се прехвърля към 0.3 мл/ cm^2 ледено студена 1.2 M HCl, към която непосредствено преди работа е прибавен за 30 мин при 0°C 10 мг/мл пресен NaNO_2 и се измива бързо два пъти с ледено студена вода и един път с 80% диметилсулфоксид

(спектрофотометрична степен на чистота, Merck)-20% 25 mM натриев фосфат (pH 6.0). За праховиден матрикс обикно вено се следва същата процедура, като се използва микрогрануларен целулозен прах (Whatman CC31). Количествата се изразяват спрямо съответното тегло на целулозния матрикс.

Първоначално ние използвахме праховиден матрикс, тъй като капацитета му на свързване е по-висок и се използват по-малки обеми за хибридизация, измиване и елюиране. Впоследствие използвахме хартиен матрикс за скриниране на индивидуалните клонове. Използването на хартия позволява ефикасно елюиране с вода, което осигурява предимство при по-нататъшното изследване на интерферон-бета мРНК. Приготвената по-горе ДНК се разтваря в 25 mM натриев фосфат (pH 6.0), загрява се 1 мин, охлажда се и се прибавят 4 обема DMSO. Свързването към матрикса (50 мг праховиден) или хартиения диск (10 мм диаметър) обикновено протича от края на настоящата до началото на следващата седмица при 40°C и непрекъснато разбъркване. Обема на ДНК се поддържа достатъчно малък, за да позволява тесен контакт с матрикса и така се увеличава ефективното свързване на ДНК с матрикса. След свързването, матриксът се измива 4 пъти с вода и 4 пъти с 0.4 N NaOH при 37°C, всеки по 10 мин, отново 4 пъти с вода при стайна температура и накрая 2 пъти с хибридизационен буфер (50% формамид (дейонизиран, Baker), 40 mM пиперазин-N,N'-бис(2-етан сулфонова киселина)(pH 6.4) ("PIPES", Sigma), 1 mM EDTA, 0.6 M NaCl и 0.1% SDS при 40°C. Ефективността на свързването се измерва с ³²P-радиоактивност.

20 мкг тотална РНК, приготвена както е описано по-горе, се разтваря в 250 мкл (50 мкл за хартиен матрикс) хибридизационен буфер и се прибавя към свързания ДНК матрикс. Матриксът се загрява до 70°C за 2 минути и се оставя да пренощува при 37°C с леко разбъркване.

Етап С - Отделяне на хибризираните обща РНК-ДНК от нехибризираната обща РНК.

След центрофугиране на праховидния матрикс, нехибризираните РНК се отстраняват и матриксът се измива 7 пъти с общо 2 мл 50% формамид, 10 mM (pH 6.4) "PIPES", 1 mM EDTA, 0.3 M NaCl и 0.1% SDS. Ниското солево съдържание при това измиване дестабилизира неспецифичното РНК-ДНК свързване. Всяко измиване е последвано от центрофугиране и ресуспендиране на матрикса в буфер. За следващия анализ, първото измиване се обединява с нехибризираната РНК ("фракция 1") и измиванията 2-4 ("фракция 2") и 5-7 ("фракция 3") също се обединяват. При хибризиране към хартиен матрикс се използва сходна процедура, с изключение на това, че общият обем за измиване е ограничен до 1 мл.

Етап D- Пречистване на хибризираната тотална РНК

Хибризираните тотална РНК-ДНК се елюират от праховидния матрикс на три пъти с общо 900 мкл 99% формамид, 0.2% SDS при 70°C за 2 минути и се охлаждат в лед. Тоталната хибридизационна процедура и елюиране с формамид се провежда изключително както е описано от A. G. Smith (лично съобщение). Хибризираните тотална РНК-ДНК се елюират от хартиения матрикс чрез първо измиване със 100

мкл ледено студена вода, последвано от двукратно елюиране с вода (общо 300 мкл) при 80°C за 2 мин. За по-нататъшните изследвания всичко се събира (фракция 4).

Към едната половина от всяка от тези 4 фракции се прибавя транспортна РНК от телешки черен дроб или рибозомна РНК (фракции 1А, 2А, 3А, 4А), а към другата половина - 8 мкг еукариотна поли(А) РНК или рибозомална РНК (фракции 1В, 2В, 3В, 4В). Фракциите се пречистват чрез преципитиране с прибавяне на 0.5 М NaCl и 2.5 обема етанол, за да се отстранят следите от формамида и други онечиствания.

Етап Е - Определяне на активността на мРНК за интерферон-бета.

Фракции 1А, 2А, 3А и 4А се прехвърлят в 25 мкл лизат от заешки ретикулоцити, третиран с нуклеаза (приготвен съгласно процедурата на R. B. Pelham и R. J. Jackson, "An Efficient mRNA-Dependent Translation System for Reticulocyte Lysates", Eur. J. Biochem., 7, pp. 247-56 (1976)) по процедурата на B. LeBleu, et al., "Translation of Mouse Interferon mRNA in Xenopus Laevis Oocytes and in Rabbit Reticulocyte Lysates", Biochem. Biophys. Res. Commun., 82, pp. 665-673 (1978) с изключение на това, че се прибавят 250 mM спермидин-HCl, 1 mM фруктозо-1,6-дифосфат в присъствието на ³⁵S-метионин (0.5 mCi/ml, Amersham). След инкубиране, 25 мкл ретикулоцитен лизат от по-горе се комбинират с 1 мкл 10% деоксихолат-10% Тритон X100 и 2 мкл антисерум-PBS (1:9) и се загряват при 37°C за 1 час. Прибавят се 20 мкл Staphylococcus aureus Cowan I (прясно измит, S. W. Kessler et al., "Rapid Isolation of Antigens from Cells with a Staphylococcal Protein A-Antibody Adsorbent: Parameters of the Interaction of

Antibody-Antigen Complexes with Protein A", *J. Immunology*, 115, pp. 1617-1624 (1975)) в 10% 100mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 0.05% NP40 и сместа се оставя 30 мин при 20°C и се центрофугира в центрофуга Eppendorf 5412 за 2 мин. Утайката се измива и се центрофугира 2 пъти с PBS и крайната утайка се разтваря в "sample" buffer" и се разделя чрез електрофореза в 13% полиакрил амиден гел както е описано от U. K. Laemmli *et al.*, "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacterio-phage T4", *Nature*, 227, pp. 680-85 (1970), и се подлагат на автордиография. Сравнението на STNV-РНК транслацион ните продукти във фракции 1А и 4А осигуряват индикация на ефективността на хибридизацията и на РНК-деградацията в този процес. Фракции 1В, 2В, 3В и 4В се разтварят в 2 мкл вода и се изследват в ооцитите за съдържание на мРНК за интерферон-бета, както е описано по-горе.

3. Последващ анализ - Хибридизация към нитроцелулозни листи

Някои следващи анализи на индивидуални клонове се правят върху нитроцелулозни листи (M. Cochet *et al.*, "Cloning of an Almost Full-Length Chicken Conalbumin Double-Stranded cDNA", *Nucleic Acid Research*, 6, pp. 2435-2452 (1979)). ДНК се разтваря в 2 M NaCl и 0.2 M NaOH, загрява се до 100°C за 1 мин, охлажда се и се нанася върху несъдържащи детергент филтри Millipore (големина на порите 0.45µm; 7мм диаметър). Филтрите се изпичат 2 часа при 80°C, измиват се в 0.3 M NaCl, 2mM EDTA, 0.1% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) и се изсушават при стайна температура. РНК се хибридизира 3 часа при 47°C в 30% формамид, 0.5 M NaCl, 0.4% SDS, 2mM EDTA, 50 mM PIPES (pH 7.5). Хибридизацията се спира чрез

разреждане с 10 обема 0.1 M NaCl и филтрите се измиват няколко пъти в 15 мл 0.3 M NaCl, 2mM EDTA, 0.1% SDS, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) чрез разклащане при 45°C и няколко пъти в същия разтвор без SDS при 4°C. Елюирането на хибридириралите РНК-ДНК се задействува в 30 мкл 5 mM калиев хлорид при 100°C за 1 мин.

4. Резултати от селекционното хибридиране на РНК

Скринират се 16 групи по около 46 клона (групи А-Р). В шест от тях фракция 1В съдържа активност само на мРНК за интерферон-бета, в осем от другите не се отбелязва активност на мРНК за интерферон-бета и в две от групите (групи С и О) мРНК за човешки интерферон се наблюдава във фракция 4В. Изследванията на групи С и О се отчитат по следния начин: логаритъм от единици интерферон-бета (калибрирани срещу референтен стандарт 69/19), отбелязани при изследване на фракция 1В (нехибридизирани) и изследване на фракция 4 В (хибридизирани). Границата на отчитане е 0.1.

<u>Група</u>	<u>Фракция 1В</u>	<u>Фракция 4В</u>
С	1.0	0
	0.5	0.5
	0	0.2
О	0	0
	0.2	0.5

Група О е подразделена на 6 подгрупи (подгрупи О₁ до О₆; четири по осем клона и две по седем) и хибридирирана и изследвана както е описано преди, с изключение на това, че са използвани 400 мл култура за всеки клон. Подгрупите

дават следните резултати, представени в същия формат, както по-горе. Хибридизирането се провежда върху DMВ-целулозен прах, освен ако не е посочено друго.

<u>Подгрупа</u>	<u>Фракция 1В</u>	<u>ФРАКЦИЯ 4В</u>
O ₁	0	1.2
	0	1.5
	0	0.5
	0	0.5
	0.2	0.5
	0	1.2*
O ₂	0.7	0
O ₃	0.7	0
	0.5	0
O ₄	0	0
O ₅	0.5	0
O ₆	0	0

Подгрупа O₁ е подразделена на нейните индивидуални клонове

(обозначени като клонове O_{1/1} - O_{1/1}) и хибридизирана и изследвана както е описано преди, с изключение на това, че са използвани 700 мл култура за всеки клон. Хибридизирането отново се провежда върху DMВ-целулозен прах, освен ако не е посочено друго.

<u>Клон</u>	<u>Фракция 1В</u>	<u>Фракция 4В</u>
O _{1/1}	0.2	0
	0.7	0
	0.7	0*

*Метод с целулозна хартия дЪМ

<u>Клон</u>	<u>Фракция 1в</u>	<u>Фракция 2в</u>
O _{1/2}	1.0	0**
	1.2	0
	0.2	0*
O _{1/3}	0.7	0**
	1.2	0
	1.0	0.2*
O _{1/4}	1.2	1.0(?)*
	1.2	0**
	1.2	0
	1.2	0
	1.0	0*
O _{1/5}	1.2	0**
	0.7	0
	0.7	<0.2*
O _{1/6}	1.0	0
	0.7	0
	1.0	<0.2**
O _{1/7}	0.5	0**
	0.5	0
	1.2	0*
O _{1/8}	<0.2	0.5**
	0	1.7*
	<0.2	1.2*
	0	0.7**
	0	1.0**

Следователно, клон O_{1/8} съдържа рекомбинантна ДНК молекула, способна да хибридизира с мРНК за интерферон-бета от общата РНК, съдържаща мРНК за интерферон-бета.

*Метод върху целулозна хартия дЪМ

** Нитроцелулозни листа

Неспецифичното РНК-ДНК свързване е малко вероятно, тъй като сравнението на фракции 1А и 4А показва, че няма съществено неспецифично свързване на STNV-ДНК в същите експерименти, т. е. транслация в заешки ретикулоцитен лизат в присъствие на ^{35}S -метионин, последвана от гел-електрофореза, както е описано по-горе. Клон О_{1/8} е обозначен E. coli HB101 (G-pBR322(Pst)/rHFIF1 ("G-HB101-rHFIF1"), неговата рекомбинантна ДНК молекула G-pBR322(Pst)/rHFIF1 ("pHFIF1"), и неговият хибриден инсерт "pHFIF1 фрагмент". Тази номенклатура показва, че клонът и рекомбинантната ДНК молекула произлизат в Гент ("G") и се състоят от плазмид pBR322, съдържащ при PstI мястото кДНК за човешки интерферон-бета, съответната молекула е първата установена. ("1").

ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА КЛОНОВЕ, СЪДЪРЖАЩИ РЕКОМБИНАНТНИ ДНК МОЛЕКУЛИ, КРЪСТОСАНО-ХИБРИДИЗИРАЩИ С rHFIF1

rHFIF1 се използва за скриниране на библиотеката от клонове, получена предварително, за бактериални клонове, съдържащи рекомбинантни ДНК молекули, имащи сродни хибридни ДНК инсерти, при хибридизиране на колонии (M. Grunstein and D. S. Hogness, "A Method for the Isolation of Cloned DNA's that Contain a Specific Gene", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, pp. 3961-3965 (1975)). Този метод позволява бърза идентификация на родствени клонове, чрез хибридизиране на радиоактивна сонда, направена от rHFIF1 към ДНК на лизирани бактериални колонии, фиксирани върху нитроцелулозни филтри.

Библиотеката от клонове, съхранена в микротитърни плаки, както е описано по-горе, се реплицира върху нитроцелулозни листи със сходна големина (0.45 мкм диаметър на порите, Schleicher and Schuell или Millipore), които предварително са сварени, за да се отстрани детергентът и листите са сложени върху петрита с LB-агар, съдържащи тетрациклин (10 мкг/мл). Бактериалните колонии растат до следващия ден при 37°C. Лизисът и фиксирането на бактериите върху нитроцелулозните филтри става чрез измиване последователно в 0.5 N NaOH (два пъти по 7 мин), 1 M Tris-HCl (pH 7.5)(7 мин), 0.5M Tris-HCl (pH 7.5) и 1.5 M NaCl (7 мин), 2 x SSC (0.15 M NaCl, 0.015 M Na-цитрат (pH 7.2)(7 мин). След старателно изплакване с етанол и изсушаване на въздуха, листите се изпичат за 2 часа при 80°C във вакуум и се съхраняват при стайна температура.

Hinf I рестрикционен фрагмент, специфичен за рHFIF1 фрагмента (по-долу), служи като сонда за хибридизирането на колониите, описано по-долу. Този фрагмент (прибл. 170 чифта бази) се пречиства чрез електрофореза от продуктите на смилане на рHFIF1 с Hinf I в 6% полиакриламиден гел. След оцветяване на ивиците ДНК с етидиум бромид, специфичните фрагменти се елюират, подлагат се на ре-електрофореза и се бележат с ³²P чрез "накъсано превеждане" (ник-транслация) (P. W. J. Rigby *et al.*, "Labeling Deoxyribonucleic Acid to High Specific Activity in Vitro by Nick Translation with DNA Polymerase I", *J. Mol. Biol.*, 113, pp. 237-51(1977)) при инкубиране в 50 мкл 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl₂, 20 mM бета-меркаптоетанол, съдържащ по 2.5 мкл от dCTP, dTTP и dGTP, всеки с концентрация 400 мкМ, 100 pmol алфа-ATP (Amersham, 2000Ci/mmol) и 2.5 единици от

ДНК полимераза I (Boehringer) при 14°C за 45 мин. Нереагиралите дезоксинук леотид трифосфати се отстраняват чрез гел-филтрация върху Sephadex G50 в TE буфер. Високо маркираната ³²P ДНК се преципитира с 0.1 обема 2 М натриев ацетат (pH 5.1) и 2.5 обема етанол при 20°C.

Хибридизирането на гореказаната сонда към импрегнирания с ДНК филтър се провежда точно както е описано от D. Hanaban and M. Meselson (лични контакти). Филтрите, приготвени предварително както е описано, по-горе се преинкубират 2 часа при 68°C в 0.1% фикол, 0.1% поливинилпиролидон, 0.1% говежди серумен албумин, 0.15 М NaCl, 0.03М Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA и се изплакват с 0.02% фикол, 0.02% поливинилпиролидон, 0.02% говежди серумен албумин, 0.75 М NaCl, 0.15М Tris-HCl(pH 8.0), 5 mM EDTA и 0.5% SDS. Хибридизацията продължава до следващия ден при 68°C в разтвор, идентичен с този за изплакването, и при използване на сонда, маркирана с ³²P, която е денатурирана 5 мин при 100°C непосредствено преди това. Хибридизираните филтри се измиват 2 пъти с 0.3 М NaCl, 0.06М Tris-HCl(pH 8.0), 2 mM EDTA за 2 часа при 68°C преди изсушаване на въздух и автордиография.

Скринират се около 1350 клона, произлизащи от 800-900 ДНК класа. Тринадесет колонии, включително рHFIF1 дават положителен резултат. Тези колонии се обозначават G-НВ101-рHFIF1 до 13, а техните рекомбинантни ДНК молекули рHFIF1 до 13. Една от колониите, рHFIF2, е хибридизирана с поли(А) РНК, съдържаща мРНК за интерферон-бета и е изследвана с използване на DBM-целулозна хартия (вж. по-горе). Тъй като тоталната

интерферон-РНК активност се определя в хибридирираната фракция и нехибридирираната РНК не съдържа забележима активност, ясно е че клоновете, идентифицирани чрез хибридириране на колониите към част от рНFIF1 фрагмента също хибридирират с мРНК за интерферон-бета.

Очевидно е, че този метод за скриниране на клонове, използващ ДНК инсерт от рНFIF1 за човешки интерферон-бета или друг ДНК инсерт от клон, идентифициран с използването на ДНК инсерт от рНFIF1, както е описано по-горе, може да се използва еднакво добре и за други клонове, съдържащи ДНК секвенции, произлизащи от рекомбинантна ДНК технология, синтез, естествени източници или комбинация от тях, или клонове, съдържащи ДНК секвенции, свързани с някоя от посочените по-горе ДНК секвенции посредством мутация, включително единична или множествена, заместване на бази, инсерции, инверсии или делеции. Следователно такава ДНК секвенция и нейното идентифициране също попада в рамките на това изобретение. Също трябва да бъде разбрано, че ДНК последователностите, които не са скринирани с горните ДНК секвенции, но които в резултат от подреждането на нуклеотидите си кодират полипептиди, кодирани от горните секвенции, също попадат в тези рамки.

ХАРАКТЕРИСТИКА НА СВЪРЗАНИТЕ С ИНТЕРФЕРОН-БЕТА РЕКОМБИНАНТНИ ПЛАЗМИДИ

Тринадесетте клона (рНFIF1-13), които са открити чрез хибридириране на колониите, се характеризират по-нататък. Конструирана е физическа карта на инсертите на тези

клонове и е определена ориентацията на инсертите в различни клонове.

Физическата карта на плазмидите се конструира чрез смилане с различни рестрикционни ензими (New England Biolabs) в 10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 7 mM MgCl₂ и 7 mM бета-меркаптоетанол при 37°C чрез добре познатите процедури. Продуктите от смилането се разделят чрез електрофореза в 2.2% агароза или 6% полиакриламиден гел в 40 mM Tris-НОAc (pH 7.8), 20 mM EDTA. Те се анализират след онагледяване чрез оцветяване с етидиум бромид и се сравнява с подробната физическа карта на pBR322 (J.G. Sutcliffe, по-горе). Рестрикционни карти на различните плаزمиди са конструирани на базата на образци от такива разграждания. Последните са усъвършенствувани чрез секвениране на ДНК инсертите в различните плазмиди, основно чрез процедурата на A. M. Maxam and W. Gilbert, " A New Method for Sequencing DNA", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, pp. 560-564 (1977).

Плазмидната ДНК се приготвя от някой от клоновете от рНFIF1-13 в съответствие с това изобретение по метода на Kahn et al., (по-горе), използвани предварително тук за изолиране на ДНК от партидите клонове за скриниране. Изолираната ДНК- форма I се пречиства чрез центрофугиране в неутрален захарозен градиент, както е описано, по-горе и се подлага на рестрикция с различни рестриктази, изключително като е препоръчано от снабдителя (New England Biolabs).

Разградената ДНК се дефосфорилира за 30 мин при 65°C в присъствието на 4 единици бактериална алкална фосфатаза и 0.1% SDS. Следват две фенолни екстракции и преципитация с

етанол. ДНК се бележи в 5' края с гама- ^{32}P -АТФ (прибл. 3000 Ci/mmol) и полинуклеотидкиназа (P-L Biochemicals, Inc.).

За секвениране, белязаните фрагменти се третират по два начина. Някои се пречистват върху полиакриламиден гел преди разграждането с втори рестрикционен ензим. Други веднага се разграждат с втори рестрикционен ензим. И в двата случая желаните фрагменти се разделят върху полиакриламиден гел в Tris-borate-EDTA буфер. Фигура 7 показва различни рестрикционни фрагменти (кръгчетата показват белега и стрелка с посоката на секвенирането) а стратегията на секвениране използва рHFIF1, рHFIF3, рHFIF6 и рHFIF7.

Фрагментите се разграждат съгласно метода на А. М. Maxam and W. Gilbert, (по-горе). Продуктите се разделят върху полиакриламидни гелове с различни концентрации и дължини в 50 mM Tris-борат, 1 mM EDTA (pH 8.3) при 900 до 2000V.

Всеки участък от кДНК инсерта се секвенира откъм двете вериги и всеки рестрикционен участък, който служи като маркиран край, се секвенира с фрагмент, който го обхваща. Събирателната нуклеотидна секвенция, получена по този начин за кодиращата верига на ДНК за интерферон-бета, или генът и съответната му аминокиселинна секвенция са изобразени на фигура 4. Тъй като никой от плазмидите рHFIF1-13 не съдържа пълния ген за човешки интерферон-бета, то фигура 4 се получава от комбинация от данните на поне два такива плаزمиди. Относно това, фигура 5 показва взаимната връзка между инсертите рHFIF1, рHFIF3, рHFIF6 и рHFIF7. Непрекъснатите стрелки или пунктирите показват ориентацията на различните части на инсертите.

Отнасяйки се към фиг. 4, виждаме, че хетерополимерната част на инсерта е рамкиран от едната страна със сегмент, богат на Т-остатъци, и с нишка от А-остатъци (вероятно отговарящи на поли(А)края на мРНК). За информация, инсерта е номериран от първия нуклеотид на съставния инсерт до нуклеотидно гнездо в нетранслираната част на инсерта. АТГ инициращ триплет при позиция 65-67 и ТГА терминиращ триплет при тпозиции 626-628 определят четивната рамка, която не се прекъсва от безмислени кодони. Всяка друга транслируема последователност, т.е. при различна рамка на четене, обградена от АТГ или GTG и терминационен сигнал, е много къса, за да кодира полипептид с очаквания размер на интерфрон-бета. Следователно областта между нуклеотиди 65 и 625 най-вероятно включва нуклеотидната секвенция за съставната ДНК- последователност, която кодира интерферон-бета в съответствие с настоящото изобретение.

Тази секвенция не изключва възможността мутации на гена, като мутации, включващи единични или множествени замествания на базите, делеции, инсерции или инверсии, да не протичат винаги в гена или да не участвуват съществено в модификацията на неговите свойства или в свойствата на полипептидите, кодирани от него. Тя не изключва полиморфизъм, който може да има за резултат физиологично сходни, но структурно леко различни гени или полипептиди от тези, представени на фиг.4 (по-горе, стр. 3). Например друг клон, идентифициран съгласно настоящото изобретение има "Т", вместо "С" в нуклеотид 90 от нуклеотидната последователност, кодираща интерферон-бета. Тази промяна в третия нуклеотид на кодона не променя аминокиселината, кодирана

от него. Аминокиселинната последователност, кодирана от ДНК последователността на фиг. 4 е идентична на аминокиселинната последователност описана от Taniguchi et al., по-горе.

Трябва да се отбележи, че клонираната кДНК от полиА РНК по обичайната процедура (A. Elefstradiadis et al., по-горе) може да няма 5' терминални нуклеотиди и може дори да съдържа артефактни секвенции (R. I. Richards et al., "Molecular Cloning and Sequence Analysis of Adult Chicken Beta-Globin cDNA", Nucleic Acid Research, 7, pp 1137-46 (1979)). Следователно не е сигурно, че ATG локализирани при нуклеотиди 65-67 са в действителност първите ATG на автентичната интерферон-бета кодираща секвенция. Обаче за целите на следващото описание се приема, че ATG при нуклеотиди 65-67 са първите ATG от автентичната мРНК за интерферон-бета.

При сравнение на полипептида, кодиран от тази област на инсера α секвенцията от 13 N-терминални аминокиселини на автентичен човешки фибробластен интерферон - MetSerTyrAsnLeuLeuGlyPheLeuGlnArgSerSer - определена от Knight et al., изглежда, че избраната рамка на четене е коректна и че нуклеотидите 65-127 може би кодират сигнален пептид, който предхожда нуклеотидната последователност, кодираща "зрелия" полипептид.

В допълнение в еукариотните мРНК първият AUG триплет откъм 5' края е обикновено инициращото място за протеинов синтез (M. Kozak, "How Do Eukaryotic Ribosomes Select Initiation Regions in Messenger RNA?", Cell, 15, pp. 1109-25 (1978)). Тук кодонът в съставния фрагмент, отговарящ на първата аминокиселина на фибробластния интерферон е на

разстояние 22 кодона от първия ATG-триплет. Това отново дава основание да се предполага че ДНК секвенцията, кодираща фибробластен интерферон, може би се предхожда от секвенция, определяща сигнален полипептид от 21 аминокиселини. Предполагаемата сигнална секвенция съдържа серия от хидрофобни киселини. Такова акумулиране на хидрофобни документи е характерно за сигналните секвенции (с.ф., В. D. Davis and P.C. Tai, "The Mechanism of Protein Secretion Across Membranes", Nature, 283, pp. 433-38 (1980)).

Както изглежда, нуклеотидната последователност, отговаряща на зрелия човешки интерферон-бета, съдържа 498 нуклеотиди, които кодират 166 аминокиселини. Приемайки, че тук няма разтеж откъм киселинния край, молекулното тегло на полипептида на интерферона е 20085. Композицията на базите на кодиращата последователност е 45% G+C. Използуването на кодоните в кодиращата интерферон секвенция е в логично съгласие с приетото за мРНК на бозайници изобщо (R. Grantham et al., "Coding Catalog Usage and the Genome Hypothesis", Nucleic Acid Research, 8, pp. 49-629 (1980)). Всяко наблюдавано отклонение може да се припише на малкия брой включени примери.

Структурата на полипептида, изобразен на фигура 4 за съставния фрагмент, разбира се не включва в сметката модификации на полипептида, причинени от неговото взаимодействие с *in vivo* ензимите, напр. гликозилирането. Следователно, трябва да разбираме, че аминокиселинната секвенция, изобразена на фигура 4, може да не бъде идентична с човешки интерферон-бета, продуциран *in vivo*.

Сравнението на първите 13 аминокиселини на автентичен фибробластен интерферон (Knight *et al.*, по-горе) със секвенцията, получена по пътя на дедукция от съставния ген на фиг. 4 не показва разлики. Аминокиселинната секвенция, определена директно за автентичен фибробластен интерферон от една страна, и тази, получена чрез дедукция от последователността на съставния ген на това изобретение от друга, също показват съществени прилики. Фигура 6 показва сравнение между тези композиции.

При все че никоя от рекомбинантните ДНК молекули, първоначално получени в съответствие с това изобретение, не съдържа пълната ДНК секвенция за фибробластен интерферон, те наистина осигуряват полезни сонди за скриниране на ДНК последователности за откриване на такива, които са родствени на човешки интерферон-бета. По-нататък, комбинация от части от инсертите на тези рекомбинантни ДНК молекули, така че да се получи пълна кодираща секвенция за интерферон-бета е, както се вижда по-долу въпрос на сръчност. Например при справка с фиг. 5 и фиг. 8, лесно може да се види че PstI-BglII фрагмент от рHFIF6 може да се присъедини към PstI-HaeII фрагмент от рHFIF7 или EcoRI-PstI фрагмент от рHFIF6 може да се присъедини към PstI-HaeII фрагмент от рHFIF7 или BglII-PstI фрагмент от рHFIF6 може да се присъедини към PstI-BglII фрагмент от клон 7 за формиране на съставна, кодираща човешки интерферон-бета секвенция. Съединяването на тези фрагменти може да бъде направено преди или след вмъкването на клонирания фрагмент в желанния плазмид.

ПОЛУЧАВАНЕ НА ПЛАЗМИДИ, СЪДЪРЖАЩИ
ПЪЛНАТА ДНК ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ, КОДИРАЩА
ЧОВЕШКИ ИНТЕРФЕРОН-БЕТА С ЦЕЛ
ЕКСПРЕСИРАНЕ НА ПОЛИПЕПТИДИ, ПРОЯВЯВАЩИ
АКТИВНОСТ НА ЧОВЕШКИ ИНТЕРФЕРОН-БЕТА

Бактериофагът ламбда съдържа два силни промотора P_L и P_R , чиято активност е под контрол на репресорен протеин, който е продукт на фаговия ген *с1*. В присъствие на репресора, транскрипцията от тези промотори е напълно подтисната. Отстраняването на репресора включва силна транскрипция от P_L и P_R (за справка вж. H. Szybalski и W. Szybalski, "A Comprehensive Molecular Map of Bacteriophage Lambda", Gene, 7, 217-270 (1979)).

Производните на плаزمид с множество копия pBR322 (F. Bolivar et al., "Construction and Characterization of New Cloning Vehicles. II. A Multiple Cloning System", Gene, 2, pp. 95-113 (1977)) са конструирани да включват P_L промотора.

A. Структура на плазмиди съдържащи P_L промотор

Плазмид pPLa2311

Плазмид pPLa2311 (показан на фиг.8) се състои от три HaeII фрагменти. Най-големия фрагмент, около 1940 чифта бази, съдържа P_{LO_L} област от бактериофага ламбда и областта на гена за бета-лактамаза от pBR322 (J. Sutcliffe, "Complete Nucleotide Sequence of the Escherichia coli Plasmid pBR322", Cold Spring Harbor Symposium, 49, I, pp. 77-90 (1978)). Съседен на този фрагмент е 370 нуклеотидни чифта дълъг HaeII фрагмент, произлизащ от плазмид Col E1. Започването на репликацията обхваща свързката между тези два фрагмента (A. Oka et al., "Nucleotide Sequence of Small ColE1 Derivatives.

Structure of the Regions Essential for Autonomous Replication and Colicin E1 Immunity", Mol. Gen. Genet., 172, 151-159 (1979)). Третият HaeII фрагмент, с около 1600 нуклеотидни чифта дължина кодира резистентността към канамицин. Този фрагмент първоначално произхожда от плазмид pCR1 (C. Covey et al., "A Method for the Detection of Restriction Sites in Bacterial Plasmid DNA", Mol. Gen. Genet., 145, 155-158 (1976)). Посоката на транскрипция от P_L промотора е по същия начин както при бета-лактамазния ген. Плазмид pPLa2311 дава резистентност към 100 мкг/мл карбеницилин и 50 мкг/мл канамицин.

Плазмид G-pPLa8

Плазмид G-pPLa8 (показан на фигура 9) е получен от pPLa2311 чрез превръщане на PstI мястото в бета-лактамазния ген в BamHI място. Това се извършва чрез третиране на отворен PstI pPLa2311 с S₁ нуклеаза, последвано от лигиране на тъпия край към BamHI свързващ фрагмент (линкер) (получен от Collaborative Research Inc., Waltham, Mass.) и рециркуларизиране на молекулата след разцепването с BamHI. Плазмид pPLa8 вече не носи резистентност към карбеницилин, но все още притежава резистентност към канамицин.

Плазмид G-pPLc24

Плазмид G-pPLc24 (показан на фиг.10) съдържа бета-лактамазния ген и началото на репликация от pBR322. HaeII-EcoRI фрагмент, дълъг 290 нуклеотидни чифта, съдържа P_{LOL} областта от бактериофага ламбда. Посоката на транскрип-

цията от P_L промотора е към EcoRI участъка. EcoRII-VamHI фрагмент, дълъг 431 нуклеотидни чифта, кодира участъка за свързване с рибозомата и първите 98 аминокиселинни остатъка на репликазияния ген на бактериофага MS2, получен от плазмидида pMS2-7 (R. Devos et al., "Construction and Characterization of a Plasmid Containing a Nearly Full- Size DNA Copy of Bacteriophage MS2 RNA", J. Mol. Biol., 128, pp. 595-619 (1979)). Транслацията на MS2 репликазияния протеинен фрагмент протича колинеарно с транскрипцията от P_L промотора.

В. Температурно-зависимо запускане на P_L промоторната активност.

Транскрипцията от P_L промотора - присъстващ върху pPLa2311, pPLa8 и pPLc24 плазмидите - се репресира чрез поддържане на плазмидите в щам E.coli, който синтезира репресорен протеин. В резултат на своя авторегулиращ се път на синтез (M. Ptashne et al., "Autoregulation and Function of a Repressor in Bacteriophage Lambda", Science, 194, 156-161 (1976)), едно копие от cI гена в хромозомата на лизогенен щам е способно да репресира напълно P_L промотор, присъстващ върху плазмид с множество копия.

Щамовете, използвани в това изобретение, са E.coli K12 HI (K12ΔM72 lac_{am} trpEA2 Sm^R(lambda c1857 N_{am}7N_{am}53 HI bio); U. Bernard et al., "Construction of Plasmid Cloning Vehicles that Promote Gene Expression from the Bacteriophage lambda P_L Promoter", Gene, 5, 59-76, (1979)) и E.coli M5219 (K12ΔM72 lac_{am} trp_{am} Sm^R (lambda1857 HI bio 252); H. Greer, " The kil Gene of Bacteriophage lambda", Virology, 66, 589-604 (1975)). И двата щамата съдържат дефектен, неизрязваем ламбда профаг,

носещ мутантен *cI* ген. Мутантният ген кодира температурно-чувствителен репресор, като по този начин позволява запускането на транскрипцията от P_L промотора чрез промяна в температурата - при 28°C репресорът е активен и репресира транскрипцията от P_L промотора, обаче при 42°C репресорът се инактивира и транскрипцията от P_L промотора се включва.

ДНІ делецията на профага отстранява част от *cro* гена и всички останали гени наядно от него (M. Castellazzi *et al.*, "Isolations and Characterization of Deletions of Bacteriophage Lambda Residing as Prophage I *E. coli* K12", Mol. Gen. Genet., 117, 211-218 (1972)). Делецията на гена *cro* е предимство, защото е известно, че натрупването на *cro* протеин подтиска транскрипцията от P_L промотора (A. Johnson *et al.*, "Mechanism of Action of the *cro* Protein of Bacteriophage Lambda", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1783-1787 (1978)). Щамът M5219 в добавка съдържа bio 252 делеция, която отстранява всички гени наляво от *cIII*, с изключение на *kil*.

При температурна индукция щамът M5219 експресира N-генен продукт. Щамът K12ДНІ от друга страна има две amber мутации в N, които го правят функционално N-негативен. Известно е, че продуктът на N гена действа като анти-терминатор в бактериофага ламбда (J. W. Roberts, "Transcription Termination and Late Control in Phage Lambda", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3300-3304 (1975)). Анти-терминационния ефект също се наблюдава при терминационни последователности, които естествено не присъствуват в ДНК на фага ламбда (например естествения стоп при края на *trp* оперона), което осигурява стартовете на

РНКтранскрипта при P_L промотора. По-нататък, полярните ефекти, обусловени от присъствието на безмислен кодон в P_L транскрипта се освобождават под действието на N генния протеин (за справка вж. N. Franklin and C. Yanofsky, "The N Protein of Lambda: Evidence Bearing on Transcription Termination, Polarity and the Alteration of E.coli RNA Polymerase" in RNA Polymerase (Cold Spring Harbor Laboratory, 1976) pp. 693-706).

Следователно имайки гореспоменатите плазмиди в термоиндуцируема бактериална λ основа, можем да си позволим експериментално включване и изключване на активността на P_L промотора. Избирането на K12 Δ NI или M5219 позволява транскрипцията да протича в отсъствие или присъствие на N генен продукт. Последното може да бъде предимство, както е описано по-горе, в случаите, когато ДНК областите, които ще се транскрибират, съдържат терминаращи секвенции или секвенции, забавящи РНК полимеразата.

С. Конструкция на клоновете, които имат ДНК секвенция, кодираща човешки интерферон-бета, вмъкната в плазмид, съдържащ P_L промотор.

В следното описание изолирането на плазмидната ДНК, рестрикционния анализ на ДНК и лигирането на ДНК фрагментите се извършва както е описано по-горе за клониране на двойноверижна ДНК. Трансформационният етап също е описан по-горе с изключение на това, че когато K12 Δ NI и M5219 се използват за гостоприемник се прави

топлинен шок при 34°C и трансформираните клетки се инкубират при 28°C.

1. Конструиране на плазмид G-pPLa-HFIF- 67-1

Рационално за тази конструкция е наблюдението, че комбинация от подходящи рестрикционни фрагменти от клоновете G-pBR322(Pst)HFIF-6 и G-pBR322(Pst)HFIF-7, позволяват реконструкцията на пълна, продължително кодираща секвенция за интерферон-бета. Потокът на получаваните фрагменти по време на няколко конструкционни етапа е показан схематично на фиг.8. Плазмидът G-pBR322(Pst)HFIF-6 беше разграден с EcoRI и PstI и лигиран към плазмид G-pBR322(Pst)HFIF-7, който е разграден с PstI и PvuI. След лигрането сместа се смисла с EcoRI и HaeII. 4 пъти моларен излишък от тази смес беше след това лигиран към плазмид G-pPLa2311, който е разграден с HaeII и EcoRI. Трансформантите се получават в щам C600г λ к⁺(lambda) (който се използва поради своята относително висока трансформационна способност и защото съдържа див тип ci ген) при селекция за резистентност към канамицин. От 15 скринирани трансформанти два са загубили резистентността си към карбеницилин. Рестрикционният анализ на ДНК, изолирана от плазмидите на тези трансформанти, показва, че един от тях има желаната структура на G-pPLa-HFIF- 67-1, представена на фиг 8. Този плазмид съдържа уникално EcoRI място и уникално PstI място. Комбинираното EcoRI-PstI разграждане дава два фрагмента. Малкият комигрира с фрагмент, получен от EcoRI-PstI разграждане на G-pBR322(Pst)HFIF-6. BglII разграждането отделя малък фрагмент от около 650 нуклеотидни чифта. Размерът на последния фрагмент е съвместим с очаквания размер след

присъединяване на проксимален BglII-PstI фрагмент от клон G-pBR322(Pst)HFIF-6 към дисталната PstI-BglII част от G-pBR322(Pst)HFIF-7. HincII разграждането дава три фрагмента, както се очаква от присъствието на HincII мястото в P_L областта, аминок-терминалната част на бета-лактамазния ген и нетранслирания 5' край на ДНК секвенцията за човешки интерферон-бета. Плазмидът е обозначен като G-pPLa-HFIF-67-1.

Базирайки се на гореспоменатото характеризирание чрез рестрикционно - ензимен анализ, плазмидът G-pPLa-HFIF-67-1 би трябвало да съдържа пълната кодираща секвенция за човешки интерферон-бета. Посоката на желаната транскрипция протича колинеарно с тази от P_L промотора. Между P_L и HuIFN-beta кодиращата секвенция плазмидът все още запазва поли (А-Т) опашка и един обърнат 3' краен фрагмент, както в G-pBR322(Pst)HFIF-6.

2. Конструиране на плазмид G-pPLa-HFIF-67-12

Следващото стъпало в конструкцията цели отстраняването от G-pPLa-HFIF-67-1 на поли (А-Т) опашката и част от инвертирания 3' краен фрагмент (вж. фиг. 9). G-pPLa-HFIF-67-1 ДНК се смилва с BglII и HpaII. Тъй като кодиращата човешки интерферон-бета секвенция не съдържа HpaII участък това смилане води до BglII фрагмент, съдържащ цялата кодираща последователност за интерферон-бета и в същото време инактивира останалата част от вектора. Полученият BglII фрагмент се лигира към плазмид G-pPLa8, който е обработен с VamNI. Ензимите BglII и VamNI произвеждат идентични висящи краища, така че BglII

краищата могат да се лигират към отворен BamHI участък и обратно. Такова реконструирано място повече не е субстрат на BglII или BamHI, но се разпознава от ензима Sau3aI(MboI) (V. Pirotta, "Two Restriction Endonucleases from *Bacillus globigii*", Nucleic Acid Research, 3, 1747-1760 (1976)). След лигирането сместа отново се разцепва с Bam HI, за да се елиминират тези G-pPLa8 молекули, които са рециркуларизирали. Трансформантите отново се получават в $S600g_{\text{KMK}}^+(\lambda)$, селектирайки за резистентност към канамицин.

Трансформантите се скринират чрез определяне големината на неразградената ДНК върху агарозен гел както е описано по-горе за характеризиране на сродните на интерферон-бета рекомбинантни плазмиди. Клоновете, които са леко по-големи от родителския G-pPLa8, се подлагат по-нататък на рестрикционен анализ с PstI или HincII. Установено е, че един от клоновете съдържа единично PstI място и три HincII места. Един фрагмент от този клон комигрира с HincII фрагмент от pPLa8 който се получава от P_L до бета-лактамазната област. Друг малък фрагмент от клона измерен около 400 нуклеотидни чифта -съвместим с инсерция-та от BglIII фрагмента в G-pPLa8 по отношение на ориентацията спрямо P_L промотора. Този плазмид е обозначен G-pPLa-HFIF- 67-12. Етапите, използвани за конструкцията на този плазмид са показани схематично на фиг.9. По детайлна карта на този плазмид е показана на фиг. 11. Размерът на плазида (ок.4450 нуклеотидни чифта) е определен чрез размера на неговите съставни фрагменти, а те на свой ред се определят чрез относителната им подвижност при електрофореза в агарозен гел.

E. coli K12 Δ HI и M5219 тогава се трансформират с характеризирания плазмид G-pPLa-HFIF-67-12. Проверката на на определените нуклеотидни последователности около BglII/VamHI свързването в G-pPLa-HFIF-67-12 показва интересно явление. Полипептидът, започващ при AUG на бета-лактамазната кодираща секвенция на този плазмид завършва при двоен amber кодон, локализиран в непреведения 5' край на секвенцията, кодираща човешки интерферон-бета. Тези терминационни кодони са разположени 23 нуклеотида преди инициращия AUG кодон на сигналния пептид на HuIFN-beta т.е.:

181* Съединение VamHI/BglII
 CCC.CGG.AUC.UUC.AGU.UUC.GGA.GGC.AAC.CUU.UCG.
 Pro - Arg - Ile - Phe - Ser - Phe - Gly - Gly - Asn - Leu -
 ←Ser -

AAG.CCU.UUG.CUC.UGG.CAC.AAC.AGG.UAG.UAG
 Lys - Pro - Leu - Leu - Trp - His - Asn - Arg am am

GCGACACUGUUCGUGUUGUCAAC - (HuIFN-beta
 сигнален пептид кодираща секвенция) -AUG-(секвенция,
 кодираща зрял HuIFN-beta)

Оградената фигура показва номера на аминокиселинния остатък в бета-лактамазния протеин на pBR322 (J. Sutcliffe, по-горе). Звездичката (*) показва, че CCU кодонът присъстващ при тази позиция върху pBR322, е сменен с CCC, като следствие от конверсията на PstI мястото в pPLa2311 с VamHI място в pPLa8 (вж. по-горе).

Следователно, тази конструкция отваря възможности за реинициране при AUG на сигналния пептид на HuIFN-beta и следователно възможна експресия на интерферон-бета, свързан със своя сигнален пептид, но не и към част от бета-лактамаза. Такова вътрешно реинициране, следващо преждевременно терминиране е наблюдавано в репресорния ген за лактозния оперон на *E.coli* (T. Platt *et al.*, "Translational Restarts: AUG Reinitiation of a lac Repressor Fragment", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69, 897-901 (1972)). Тази конструкция вероятно дава възможност за екскретиране на зрелия интерферон-бета при правилно бактериално разпознаване на сигналната секвенция на човешки интерферон-бета.

3. Конструирание на плазмид G-pPLa-HFIF- 67-12A19

От познатите последователности на pBR322 и кодиращата човешки интерферон-бета секвенция може да се изведе тази делеция от G-pPLa-HFIF-67-12 на малкия HincII фрагмент (от вътрешността на бета-лактамазата до три нуклеотида срещу AUG, инициращ сигналния пептид на HuIFN-beta), водещ до продължително стартиране на транслационната рамка за четене при AUG на бета-лактамазата и завършване след кодиращата секвенция за човешки интерферон-бета. Тази конструкция е следователно определена да кодира полипептид, състоящ се от 82 аминокиселинни остатъка от бета-лактамазната кодираща секвенция, един аминокиселинен остатък, кодиран при слятото HincII място, сигналния полипептид за HuIFN-beta и зрял HuIFN-beta т.е.:

82

GUU.AAC.AUG-(кодираща последователност за сигналния
Val - Asn - Met

полипептид за HuIFN-beta)-AUG--(кодираща последователност за зрял HuIFN-beta)

Оградената фигура показва номера на аминокиселинния остатък в бета-лактамазния протеин на pBR322 (J. Sutcliffe, по-горе). Следователно тази конструкция може да позволи експресирането на слят полипептид, състоящ се от част от бета-лактамаза, слята чрез една аминокиселина със сигналния пептид на HuIFN-beta, който от своя страна е свързан със зрял HuIFN-beta. Такъв слят протеин може да се екскретира от клетката.

G-pPLa-HFIF-67-12 се смила частично с HincII. Следва лигиране при концентрация на ДНК около 0.01 мкг/мл., ДНК е разградена с Xor II, един изошизомер на PvuI, произвеждащ 3' изпъкнали краища (R. Wang et al., Biochim. Biophys. Acta, in press) и религиране при ниска ДНК концентрация. Родителската G-pPLa-HFIF-67-12 съдържа две XorII места: едното инактивира канамициновия ген, а другото е локализирано в HincII фрагмента, който се отделя от плазмида. Целта на разграждането с XorII и религирането е да се елиминират родителските молекули, които не са разградени с HincII. Такива молекули съдържат две XorII места и при условията, използвани за лигиране е много малко вероятно отново да се свържат. Трансформантите се получават в $S600r_K-m_K^+(\lambda)$, селективен за канамицин и скриниран чрез рестрикционен анализ за присъствието на единично PvuI място. По-нататъшният анализ на клоновете продължава чрез разграждане с HincII. Един клон, в който липсва малкият HincII фрагмент, но от друга страна е идентичен на G-pPLa-HFIF-67-12, се обозначава G-pPLa-

HFIF-67-12Δ19. Етапите, използвани в конструирането на този плазмид са показани схематично на фиг. 9. По-подробна карта на този плазмид е показана на фиг. 12. Размерът на плазмидата (ок. 4500 нуклеотидни чифта) се определя чрез обобщаване на размера на съставлящите го фрагменти, които на свой ред се определят чрез относителната им подвижност в агарозен гел. *E. coli* K12ΔHI и M5219 след това се трансформират с характеризирания плазмид G-pPLa-HFIF-67-12Δ19.

4. Конструиране на плазмид G-pPLc-HFIF- 67-8

Плазмидът G-pPLc24 предлага друга възможност за вмъкване на секвенции за NuIFN-beta по такъв начин, че да може потенциално да се синтезира друг слят полипептид. Вмъкването на BglII фрагмент от G-pPLa-HFIF-67-1 в BamHI участъка на G-pPLc24 води до създаване на продължителна четивна рамка, кодираща 98 аминокиселинни остатъка от MS2 репликазияния ген (W. Fiers *et al.*, "Complete Nucleotide Sequence of Bacteriophage MS2 RNA: Primary and Secondary Structure of the Replicase Gene", *Nature*, 260, 500-507 (1976)). 27 аминокиселини се кодират от участъка между BglII мястото и инициращия AUG на сигналната секвенция на човешки интерферон-бета:

98
 UGG GAU.CUU.CAG.UUU.CGC.AGG.CAA.CCU.UUC.GAA.
 Trp - Asp - Leu - Gln - Phe - Arg - Arg - Gln - Pro - Phe - Glu

GCC.UUU.GCU.CUG.GCA.CAA.CAG.GUA.GUA.GGC.GAC.
 Ala - Phe - Ala - Leu - Ala - Gln - Gln - Val - Val - Gly - Asp

ACU.GUU.CGU.GUU.GUC.AAC.AUG-(кодираща секвенция Thr - Val - Arg - Val - Val - Asn -Met

на сигналния полипептид на HuIFN-beta)-AUG-(секвенция, кодираща зрял HuIFN-beta)

Оградената фигура показва номера на аминокиселинния остатък в MS2 протеина на репликазияния ген (R. Devos *et al.*, по-горе; W. Fiers *et al.*, по-горе). Следователно тази конструкция може да позволи експресията на слят полипептид, съдържащ част от MS2 репликаза, свързана с 27 аминокиселинни остатъка със сигналния пептид за човешки интерферон-бета, който от своя страна е свързан със зрелия човешки интерферон-бета.

G-pPLa-HFIF-67-1 ДНК се смела с BglII и се лигира с VamHI-разграден pPLc24 ДНК. Лигиращата смес се обработва с VamHI, за да се елиминират родителските молекули pPLc24 и се трансформира в C600гк-мк⁺(lambda), селективен за резистентност към карбеницилин. Трансформантите се анализират чрез рестрикция с HincII. От познаването на местата за рестриктазно разграждане в pPLc24 може да се предвиди, че инсерцията от BglII-IFN-beta фрагмента с ориентация по отношение на P_L ще даде един допълнителен HincII фрагмент с дължина около 650 нуклеотидни чифта. Представителен клон, проявяващ тази конфигурация, е обозначен G-pPLc-HFIF-67-8. Етапите, използвани при конструирането на този плазмид, са показани схематично на фигура 10. По-подробна карта на плазмида е показана на фиг. 13. Размерът на плазмида (ок. 3850 нуклеотидни чифта) се

определя чрез обобщаване на размера на съставлящите го фрагменти, които на свой ред се определят чрез относителната им подвижност в агарозен гел. E. coli K12ΔHI и M5219 след това се трансформират с характеризирания плазмид G-pPLc-HFIF-67-8.

5. Конструирание на плазмид G-pPLa-HFIF- 67-12Δ279T

Плазмидът рКТ 279 (подарък от К. Talmage; рКТ279 е произведен на рBR322, имащ делеция на част от гена за бета-лактамаза и PstI място, конструирано при аминокиселина 2. на бета-лактамазата) се смила с PstI, краищата се отстраняват и фрагментът се прави с тъпи краища посредством E.coli ДНК полимераза I (Klenow фрагмент) в присъствие на дезокси-нуклеотид трифосфати. Линеаризирания с PstI и с тъпи краища фрагмент от рКТ279 след това се смила с EcoRI за да се получи фрагмент, който между другото кодира сигналната секвенция на бета-лактамазата и първите 4 аминокиселини на зрелия протеин.

Този малък фрагмент след това се използва, за да замести HpaI-EcoRI фрагмент от G-pPLa-HFIF-67-12Δ19 (HpaI мястото е резултат на по-горе описаната делеция от G-pPLa-HFIF-67-12) чрез лигирането му със смлян с HpaI-EcoRI рPLa-HFIF-67-12Δ19 в присъствие на T₄ ДНК лигаза.

Предполагаемата последователност при PstI (с тъпи краища) -HpaI свързването е:

(кодираща секвенция за бета-лактамазен сигнален пептид)-

-CAC.CGC.AAC.AUG-

His - Arg - Asn- Met

(кодираща секвенция на сигналния полипептид на HuIFN-beta)-AUG-(секвенция, кодираща зрял HuIFN-beta)

Вследствие на това, получената конструкция има IFN-beta предходен от две сигнални секвенции, взети в тандем - бактериална сигнална секвенция (бета-лактамаза) и сигнална секвенция за интерферон-бета-свързани с няколко аминокиселини. Следователно тази конструкция позволява експресирането на човешки интерферон-бета, свързан с два сигнални пептида или ако тандемната комбинация между бактериалната сигнална секвенция и сигналната секвенция за интерферон-бета се разпознаят от бактериите и се разграждат коректно, конструкцията може да позволи експресирането на зрял човешки интерферон-бета и неговото екскретиране от клетката.

E. coli M5219 се трансформира с pPLa-HFIF-67-12Δ279T.

6. Конструиране на плазмид G-pPLa-HFIF- 67-12Δ218M1

Плазмид pKT218 (подарък от К. Talmage; pKT218 е произведен на pBR322, имащ делеция на част от гена за бета-лактамаза и неговата сигнална секвенция, и PstI място, конструирано при аминокиселина 4. на сигналната секвенция за бета-лактамазата) се смилва с EcoRI и AluI за получаване на фрагмент, кодиращ между другото инициалната част на сигналния пептид за бета-лактамаза. Този фрагмент се лигира в присъствие на T₄ ДНК лигаза с фрагмент, получен от смилане на pPLa-HFIF-67-12Δ19 чрез смилане с AluI в присъствие на актиномицин D (0.05 mM) (за да се среже плазмидът при AluI мястото в сигналния пептид за IFN-beta) и рестрикция с EcoRI.

Полученият плазмид, обозначен pPLa-HFIF- 67-12Δ218M1, съдържа инициалната част на полипептида, кодиращ бета-

лактамаза, част от гена, кодиращ сигналната секвенция за човешки интерферон-бета и гена, кодиращ зрял човешки интерферон-бета. Предполагамата секвенция на принадлежащата към плаزمидна област е:

4
 CAA GCU.CUU.UCC.AUG-(секвенция, кодираща зрял Hu
 Gln - Ala - Leu - Ser - Met-
 IFN-beta)

Оградената фигура се отнася до номера на аминокиселинния остатък в сигналния пептид за бета-лактамаза на рКТ218.

Следователно, тази конструкция позволява експресия на зрял човешки интерферон-бета, свързан към част от бактериалната сигнална секвенция и част от собствената си сигнална секвенция. Отново, ако бактериалния гостоприемник разпознае и коректно разгради хибридна сигнална секвенция, то зрял човешки интерферон-бета ще се експресира от плазмидна и ще се екскретира от клетката.

E. coli M5219 се трансформира с рPLa-HFIF-67-12Δ218M1.

7. Конструиране на плазмид G-pPLa-HFIF- 67-12ΔM1

Плазмид рPLa-HFIF-67-12Δ19 се линеаризира както преди чрез смилане с AluI в присъствие на актиномицин D (0.05 mM) за да се генерира срязване при AluI мястото в сигналния пептид на човешки интерферон-бета. След смилане с HpaI ДНК се рециркуларизира в присъствието на T₄ ДНК лигаза.

Полученият плазмид, обозначен G-pPLa-HFIF- 67-12 Δ M1, има само малка част от сигналната секвенция на IFN-beta, предшестваща ДНК секвенцията, кодираща зрял IFN-beta.

Предполагамата секвенция на свързването е:

82	GUU.CUC.UUU.CCA.UGA.
Val -	Leu -Phe - Pro -STOP

AUG-(секвенция кодираща зрял

HuIFN-beta)

Оградената вертикално фигура се отнася до номера на аминокиселинния остатък в бета-лактамазата. Оградената хоризонтално фигура се отнася до последователност във втората четивна рамка. Следователно транслирането на секвенцията, кодираща бета-лактамаза и останалата част от секвенцията, кодираща сигналния пептид на интерферон-бета е спряна при UGA-STOP кодона. Обаче стартовият кодон AUG за зрелия интерферон-бета присъствува на същото място, въпреки че е в различна рамка на четене. Следователно, ре-иницирането на транслацията може да се намира при тази тази точка за получаване на зрял HuIFN-beta.

E. coli M5219 се трансформира с pPLa-HFIF-67-12ΔM1.

8. Конструиране на плазмид G-pPLa-HFIF- 67-12Δ19 BX-2

Плазмид pPLa-HFIF-67-12Δ19 се линеаризира с HpaI и се третира с екзонуклеаза BAL 31, за да се отстранят нуклеотидни чифтове последователно от края на линеаризирания ДНК фрагмент (H. Gray et al., "Extracellular Nucleases of Pseudomonas Bal 31" I. Characterization of Single Strand Specific Deoxyribonuclease", Nucleic Acid Res., 2, pp. 1459-92 (1975)). Чрез вариране на времето и условията на екзонуклеазно третиране се конструират серия от ДНК фрагменти, имащи различен брой нуклеотиди от кодиращата последователност за сигналния пептид на човешки интерферон-бета, ако има

такава, предшествуващи AUG стартовия кодон на зрелия HuIFN-beta. Тези фрагменти могат да се манипулират след това, за да се конструира място за свързване с рибозомата на различни разстояния от този стартов кодон и да се даде възможност на желаната вторична структура в близост до кодона да повиши експресията на зрелия човешки интерферон-бета.

На фрагментите, третирани с екзонуклеаза, краищата им се правят тъпи с ДНК полимераза I от E.coli (Klenow фрагмент) в присъствието на dATP и dGTP за запълване на 5' изпъкналите краища. След това двойноверижен XhoI линкер, притежаващ секвенцията 5'-CCTCGAGG-3' (Collaborative Research), се лигира върху ДНК фрагментите с тъпи краища. Тези фрагменти се отварят след това с двойноверижен EcoRI линкер, имащ секвенцията 5' -CCGAATTCGG-3' (Collaborative Research). След смилането с EcoRI, фрагментите имащи лепливи EcoRI краища, се рециркуларизират с E. coli ДНК лигаза. Използуването на тази лигаза вместо T₄ ДНК лигаза избягва рециркуларизирането на фрагментите с тъпи краища. Един плазмид се избира и се обозначава като pPLa-HFIF-67-12Δ19 BX-2. Той има XhoI място около 25 нуклеотидни чифта срещу AUG стартовия кодон за зрял HuIFN beta. XhoI мястото се предшествува от EcoRI място, генерирано от лигирането на EcoRI линкер на HpaI фрагмент към EcoRI участък, непосредствено предшествуващ P_L промотора на pPLa-HFIF-67-12Δ19. Следователно, секвенцията, кодираща бета лактамаза, е отстранена. По-нататък, тъй като поне част от сигналната секвенция на HuIFN-beta е отстранена, е възможна експресия само на зрял човешки интерферон-бета. E. coli K12ΔHI се трансформира с pPLa-HFIF-67-12Δ19 BX-2.

ИЗОЛИРАНЕ И ХАРАКТЕРИЗИРАНЕ НА ЧОВЕШКИ ИНТЕРФЕРОН-БЕТА, ПРОИЗВЕДЕН ОТ БАКТЕРИИ

А. Получаване на бактериални екстракти

1. Процедура на индуциране

Порция от основните култури (замразени при -80°C в 50% глицерол"50% LB среда), включваща основните култури на щамовете K12ΔHI и M5219, трансформирани с плазмиди, съдържащи интерферон-бета фрагменти, описани по-горе се инжектира в прясна LB среда, съдържаща желатин, антибиотик и се култивира до насищане при 28°C . Две 500 мл партиди LB среда без антибиотик се инокулират всяка с 1 мл от наситените клетки и се култивират при енергично разклащане при 28°C до клетъчна плътност $2 \times 10^8/\text{мл}$. Едната партида се загрява до 42°C и продължава да се разклаща. В зависимост от използвания плазмид, културите се събират в различно време от превключването на 42°C . Контролната култура, която остава при 28°C , се събира в същото време, както културата при 42°C . Клетките се събират чрез центрофугиране в GSA ротор (Sorvall) при 8000 об/мин за 10 мин. Утайката се измива в 20 мл 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 30 mM NaCl и се утаява отново в SS34 ротор (Sorvall) за 10 мин при 10 000 об/мин. Утайката бързо се замразява в сух лед - метанол и се съхранява при -80°C . Когато е необходимо събраните клетки да се подложат на осмотичен шок, етапът на замразяване се пропуска. Използват се две различни процедури за лизис и екстракция на клетките.

2. ЕКСТРАКЦИОННА ПРОЦЕДУРА

Лизис А

Клетките се ресуспендират в краен обем 4 мл в по-горе описания буфер и се прибавя лизозим (Sigma) до 1 мг/мл. Инкубацията е 30 мин при 0°C. Суспензията претърпява два цикъла на замразяване и разтапяне чрез последователно потапяне в смес от етанол-CO₂ (-80°C) и водна баня (37°C). S 100 се приготвя при ултрацентрифугиране на лизираните бактерии (4 мл) в Beckman SW60 Ti ротор за 1 час при 60 000 об/мин и 4°C, след което по-нататък се използва супернатантата.

Лизис В

Лизис В се провежда както е описано по-горе (лизис А), с изключение на това, че разтворът 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 30 mM NaCl се замества с 50 mM HEPES (Sigma) - NaOH (pH 7.0), 30 mM NaCl, 3mM бета-меркаптоетанол и 3% фетален телешки серум (Gibco).

Осмотичен шок

Веднага след събирането и измиването клетъчната утайка се ресуспендира в 20% захароза, 100 mM EDTA, 100mM Tris-HCl (pH 7.4) при максимална клетъчна плътност 1×10^{10} /мл. Суспензията се държи върху лед 10 мин и след това се центрофугира 10 мин в SS34 ротор (Sorvall) при 10 000 об/мин. Захарозният разтвор се отделя внимателно от епруветката и утайката се ресуспендира в еднакъв обем вода (клетъчна плътност 1×10^{10} /мл). Ресуспендираните клетки остават върху лед 10 мин и след това се центрофугират отново 10 мин в SS34 ротор (Sorvall) при 10 000 об/мин. Супернатантата се довежда до 3% в 50 mM HEPES, (pH 7.0), 30 mM NaCl, 3mM бета-меркаптоетанол и 3% фетален

телешки серум (Gibco). Тази супернатанта се отбелязва като "осмотично-шокова супернатанта". Тя се съхранява при 0°C.

3. Преципитиране с амониев сулфат

1 мл от разтвор на $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, наситен при стайна температура, се прибавя към 0.5 мл от контролния разтвор или S-100 екстракта. Тази смес се държи върху лед поне 30 мин, след което преципитатът се утаява в Eppendorf центрофуга за 10 мин при стайна температура. Утайката се разтваря отново в PBS (фосфатно-буфериран физиологичен разтвор).

В. Титрации на интерферона

1. Директно антивирусно изследване

Човешки интерферон-бета се изследва в микротитърни плаки (Sterilin) чрез техника на инхибиране на CPE (цитопатичен ефект) в човешки фибробласти, тризомни за хромозома 21. Клетките се посяват един ден преди използването, инкубират се при серия разреждания ($\log_{10} = 0.5$) на пробите за 24 часа и се предизвикват с вирус за везикуларен стоматит (VSV)(щам Индиана) с 10^{-3} разреждане от основния разтвор, съдържащ $10^{6.9}$ миши C-929 плако-формиращи единици/мл. CPE се отбелязва на 24 час след стимулирането с VSV и крайната точка на действие на интерферона се дефинира като разреждане на пробата, причиняващо 50% редукция на вирусния CPE. Всички изследвания включват вътрешен стандарт за човешки интерферон-бета, който от своя страна е калибриран срещу стандарт за човешки фибробласти на NIH G023-902-527.

Клетъчната линия, тризомна за хромозома 21 (поради това означавана T₂₁), е получена от кожна биопсия на пациентка

със синдром на Down. Нейният кариотип е определен и показва диплоидност за всички хромозоми, с изключение на 21 (тризомна). Чувствителността на тези клетки към интерферон изглежда сравнима с чувствителността на клетъчна линия, тризомна по хромозома 21, описана от E. De Clercq et al., "Non-antiviral Activities of Interferon Are Not Controlled by Chromosome 21", Nature, 256, pp. 132-134 (1975) и E. De Clercq et al., "Chromosome 21 Does Not Code for an Interferon Receptor", Nature, 264, pp. 249-251 (1976).

При други изследвания се използва клетъчна линия E₁SM (A. Billiau et al., "Human Fibroblast Interferon for Clinical Trials: Production, Partial Purification and Characterization", Antimicrobial Agents and Chemotherapy, pp. 49-55 (1979)). Тази линия е диплоидна, фибробластна, дизомна за хромозома 21 и произхожда от двумесечен човешки зародиш. В сравнение с линия T₂₁, E₁SM е по-малко чувствителна към човешки интерферон-бета с фактор от 10.

2. Изследване с 2,5-А синтетаза

Друг метод за изследване присъствието на интерферон е с използване на 2,5-А синтетаза. Показано е, че интерферонът индуцира този ензим, който превръща АТФ(АТР) в тримери (и в по-малка степен в димери, тетрамери и мултимери) на 2,5-А. (A. Kimchi et al., "Kinetics of the Induction of Three Translation Regulatory Enzymes by Interferon", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3208-3212 (1979)).

Смесителни плоски шишета за култивиране, съдържащи култури от E₁SM клетки (A. Billiau et al., по-горе) се третират 20 часа с 1:6 разреждания на бактериални екстракти или

контролен интерферон в MEM-10% фетален телешки серум. Културите се отделят с трипсин (0.25%), EDTA (0.17%) и се измиват екстензивно със 140 mM NaCl в 35 mM Tris-буфер (pH 7.5). Всички следващи операции се провеждат при 4°C. Клетките се хомогенизират в 1.5-2.0 об. 20 mM HEPES буфер (pH 7.4), съдържащ 10 mM KCl, 1.5 mM магнезиев ацетат и 0.5 mM дитиотреитол (ДТТ)(лизис буфер I) в стъклен хомогенизатор на Dounce. Хомогенатът се центрофугира 20 мин при 10000 x g и супернатантата S10 се съхранява в течен азот, ако не се използва веднага.

Смесителни 96-гнездни микротитрационни плаки (105 клетки в 0.2 мл за 0.28 см² гнезда) се третираат с интерферон или съответния бактериален екстракт както по-горе. След 20 часово третиране плаките се охлаждат върху лед и се измиват 3 пъти със 140 mM NaCl в 35 mM Tris-буфер (pH 7.5). След това културите се лизират чрез прибавяне към всяко гнездо на 5 мкл разтвор, съдържащ 0.5% Nonidet P40 и 1 mM фенилметан сулфонил флуорид в лизисен буфер I. След енергично разклащане за 20 мин върху лед, клетъчните лизати се събират и се центрофугират 20 мин при 10 000 x g както по-горе.

3.5 мкл от лизата, приготвени както е описано по-горе (лизис А или В), се инкубират 2 часа при 31°C в 6 мкл инкубационна смес, съдържаща 100 mM калиев ацетат, 25 mM магнезиев ацетат, 10 mM HEPES/КОН (pH 7.4), 5 mM АТР, 4 mM фруктозо-1,6 бис-фосфат, 1 mM ДТТ и 20 мкг/мл поли(И)-поли(С) и 2 мкCi от лиофилизирания (алфа-³²P)-АТР (400 Ci/mmol, Radiochemical Centre, Amersham, U.K.). След спиране на реакцията чрез загряване 3 мин при 95°C и избистряне за 2 мин при 9000 x g, пробите се третираат със 150

U/ml алкална фосфатаза от телешко черво (Boehringer, Mannheim cat. nr. 405612) за 1 час при 37°C, избистря се отново и се накапва (1 мкл за проба) върху тънкослойни плаки от полиетиленимин целулоза (Polygram, cel 300 PEI 20 x 20 cm, Macherey-Nagel Co., Duren, Germany). Плаките се измиват 2 пъти в 2 л дестилирана вода и се изсушават под вакуум преди хроматография в 1 M оцетна киселина за 2-3 часа. След изсушаване те се подлагат на автордиография от 1-24 часа.

С. Установяване на активност на чевешки интерферон-бета в бактериални екстракти

1. Контролни експерименти

Два главни проблема се появяват при провеждането на погоре описаните изследвания. И двата са важни при интерпретацията на данните от изследванията. Бактериалните екстракти (включително контролните) при лизиране с погоре описаните процедури изглежда включват фактор, неродствен на интерферона, който проявява антивирусна активност. Не е ясно дали факторът сам по себе си е антивирусен агент или индуцира антивирусна субстанция, напр. интерферон, при условията на опита. Присъствието на фактора е установено че се повтаря в S100 екстрактите. Активността на фактора е често по-висока при контролните екстракти от E.coli HB101, може би поради клетъчната плътност, отколкото при K12ΔH1 или M5219, където активността на фактора е често по-малко от 0.7 log₁₀/ml. По някаква причина антивирусната активност на фактора се редуцира или дори понякога се елиминира напълно чрез

преципитиране с амониев сулфат при условията, които преципитират и интерферона при контролните експерименти. Поради антивирусната активност, дължаща се на този замърсяващ фактор, е трудно да се направят изводи за присъствието на следи от интерферон в бактериалните екстракти. Обаче е възможно да се дискриминира антивирусната активност на фактора при използване на диплоидни фибробласти E₁SM. Тези клетки са по-малко чувствителни към човешки интерферон-бета, отколкото обикновените клетки с тризомия 21. Но те са значително по-чувствителни към фактора, отколкото към *bona fide* интерферон. Например, като се използва pMS2-7 (R. Devos et al., "Construction and Characterization of a Plasmid Containing a Nearly Full-Size DNA Copy of Bacteriophage MS2 RNA", *J. Mol. Biol.*, 128, pp. 595-619 (1979)) в *E. coli* HB101 (H. Boyer and D. Rouland-Dussoix, "A Complementation Analysis of Restriction and Modification of DNA in *Escherichia coli*", *J. Mol. Biol.*, 41, pp. 459-472 (1969)) или K12ΔHI-G-pPLa2311 като контролни лизати, данните, демонстриращи този относителен ефект, са показани на следващата таблица с антивирусна активност, измерена като log₁₀ единици/мл.

	<u>T₂₁</u>	<u>E₁SM</u>
HB101-pMS2-7 (лизис А)	0.7	
HB101-pMS2-7 (лизис В, без бета-меркаптоетанол и телешки серум)	<0.2	1.2
HB101-pMS2-7 (лизис В)	не е правен	0.7
HB101-pMS2-7 (лизис В)	0.2	1.0
HB101-pMS2-7 (лизис В)	0.7	2.5
K12ΔHI-G-pPLa2311 (лизис В)	0.2	4.0

	T_{21}	E_1SM
К12ΔHI-G-pPLa2311 (42°C; с осмотичен шок)	0.5	>1.7

По-нататък присъствието на автентичен човешки интерферон-бета се отразява чрез различното отношение на стойностите $T_{21} : E_1SM$ и високата стойност на T_{21} в сравнение с тази в присъствие на фактора. Това е показано със следните данни:

	T_{21}	E_1SM	
суперна- танта с осмоти- чен шок	К12ΔHI-G-pPLa2311 (42°C) К12ΔHI-G-pPLa2311 (42°C) + HuIFN-beta(автентичен)	0.5 1.5 2.5	2.5 2.5
лизис В след пре- ципити- ране с амониев сулфат	HB101-pMS2-7 HB101-pMS2-7 + HuIFN-beta(автентичен) (прибавен преди лизиса)	0.2 2.7	2.5 2.5

Следователно, сравняването на активностите $T_{21} : E_1SM$ и измерването на абсолютната активност върху T_{21} клетките дават възможност да се използват антивирусните изследвания, описани по-горе за недвусмислено установяване присъствието на човешки интерферон-бета в бактериален екстракт. По-нататък трябва да се отбележи, че за екстр-

актите от култури на *E.coli* (независимо K12ΔHI или M5219), трансформирани с някои от плазмидите на това изобретение като G-pPLa-HFIF-67-12, G-pPLa-HFIF-67-12Δ19, G-pPLc-HFIF-67-8, G-pPLa-HFIF-67-12Δ279 T, G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI, G-pPLa-HFIF-67-12ΔMI, G-pPLa-HFIF-67-12Δ19 BX-2, такова влияние на непознатия фактор върху антивирусните изследвания е по-малко тежко. При тези изследвания, не много концентрираните естракти (напр. ако клетки от 150 мл култури при плътност 6×10^8 /мл се лизират и екстрахират в 4 мл) проявяват ниско или незабележимо ниво на антивирусната активност, дължаща се на непознатия фактор.

Присъствието на този замърсяващ фактор се наблюдава и при изследванията на 2,5-А синтетазната активност. Тук обаче факторът може да се елиминира напълно чрез преципитиране с амониев сулфат. Следователно, действителното присъствие на човешки интерферон-бета в бактериалния екстракт, различаващо се от присъствието на замърсяващия фактор, може също да бъде определено недвусмислено с тези изследвания.

Обаче екстрактите от *E.coli* HB101/G-pBR322(Pst)/HFIF-6, които имат непълна колинеарна кодираща секвенция (липсват само последните няколко нуклеотидни чифта) и затова не могат да експресират зрял полипептид, имат повтаряща се позитивна 2,5-А синтетазна активност, но не и забележима антивирусна активност. Това показва, че 2,5 - А изследванията не могат да се приемат като единствен критерий за присъствието на пълен бактериално-синтезиран интерферон. То също показва, че по-малка от пълната молекула зрял интерферон може да има полезно действие.

2,5 синтетазната активност се измерва чрез инкорпориране на ^{32}P в 2,5-А, показано с автордиография. Резултатите (повторени 3 пъти) са показани на следната таблица, с повишаващи се положителни стойности, съответстващи на повишеното инкорпориране на ^{32}P .

екстракт а/

pHFIF-6" + + +; след преципитация с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ " + +

екстракт б/

pMS2-7" + + +; след преципитация с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ " -

екстракт в/

pMS2-7 " + + +; след преципитация с $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ " -

+ HuIFN-beta

Вторият важен проблем при тези изследвания е ниското възстановяване на човешки интерферон-бета, секретирани от човешки фибробласти по време на и след различните експериментални етапи. В сравнение с левкоцитарния интерферон и с фибробластния интерферон, прибавен към S-100 екстракта, той показва само 10% ефективност, в контраст с човешки интерферон-алфа, който е със 100% възстановяване (анти-вирусните стойности са дадени в \log_{10} ед/мл, изследвани върху T_{21} клетки).

IFN-alpha, разтворен в S-100 екстракт от HB101-pMS2-7 (лизис А)	2.5
IFN-alpha, разтворен в E-MEM плюс 3% телешки серум	2.7
IFN-beta, разтворен в S-100 екстракт от HB101-pMS2-7 (лизис А)	0.7
IFN-beta, разтворен в E-MEM плюс 3% телешки серум	1.7

Други експерименти, при които интерферон-бета се прибавя към клетъчната утайка преди лизиса и екстракцията (дори когато е прибавен телешки серум до 3% като стабилизатор) показват, че се възстановяват само 10-30% от интерферон-бета.

		<u>log₁₀ ед./мл</u>	
	HEPES	T ₂₁	E ₁ SM
HB101-pMS2-7	pH 8	0.7 (10%)	1.7
плюс IFN-beta (лизис В	pH 7	1.0(20%)	1.7
без бета меркаптоета- нол и телешки серум)	pH 6	0.7(10%)	1.7
IFN-beta (без бактерии)(същото третиране като лизис В)	pH 6	1.7(50%)	1.5

По-нататък се провеждат експерименти за тестване на стабилността и възстановяването на активността на IFN-beta. Преципитиране с амониев сулфат, както е описано по-горе, в присъствие и отсъствие на бактериални екстракти, често показва редуция в титъра на антивирусните изследвания:

	<u>log₁₀ ед./мл</u>	
<u>Преципитиране с (NH₄)₂SO₄</u>	преди	след
IFN-beta	1.0	0.5
IFN-beta	2.7	2.5
HB101-pMS2-7 + IFN-beta (лизис В)	1.5	1.2
K12ΔHI-G-pPLa2311 (28°C)	1.7	1.5

	<u>LOG₁₀ ЕД./МЛ</u>	
	ПРЕДИ	СЛЕД
+ IFN-beta ((лизис В) K12ΔHI-G-pPLa2311 (28°C) + IFN-beta (лизис В)	2.2	3.0

Диализирането на интерферон-бета (до следващия ден при 4°C срещу PBS) в присъствие и отсъствие на бактериални екстракти, също обикновено довежда до намаляване възстановяването на активността на интерферон-бета:

Диализа	<u>log₁₀ единици/мл</u>	
	преди	след
IFN-beta в PBS	1.0	0.5
IFN-beta в PBS	2.7	2.5
K12ΔHI-G-pPLa8+ IFN-beta (лизис В) (28°C)	1.2	<0.2
K12ΔHI-G-pPLa8+ IFN-beta (лизис В)	3.0	1.7
K12ΔHI-G-pPLa8+ IFN-beta (лизис В)	2.5	1.0
K12ΔHI-G-pPLa8+ IFN-beta (лизис В)	1.5	0.5

Тъй като интерферон-бета спада към тип I интерферони, неговата активност би трябвало да е киселинно стабилна. Това се тества чрез диализиране на пробите в присъствие или отсъствие на бактериални екстракти до следващия ден в 5 mM глицин-HCl (pH2.2) при 4°C. Това третиране предизвиква образуването на преципитат, който се утаява в центрофуга Eppendorf при 12 000 x g за 2 мин. Супернатантата след това се тества за антивирусна активност. Въпреки, че след това третиране остава няква вирусна активност, то имаме съществена загуба на количеството възстановен интерферон.

Диализа	$\log_{10} \text{с.д./мл}$	
	преди	след
НВ101-pMS2-7 (лизис А)+ IFN-beta	0.7	0.5
К12ΔНІ-G-pPLa2311 (28°C) + IFN-beta след осмотичен шок	1.2	1.2
М5219-G-pPLa8(42°C)(лизис В) + IFN-beta	1.2	0.7
М5219-G-pPLa8(28°C)(лизис В) + IFN-beta	3.0	2.0

Намаляването на активността на човешки интерферон-бета, наблюдавано при тези различни въздействия върху описаните по-горе екстракти трябва да се интерпретира внимателно. Ниските антивирусни титри не винаги означават, че интерферонът е разграден. Те могат да се дължат на неспецифично залепване на NuIFN-beta към диализните мембрани или на компоненти в бактериалните екстракти (напр. мембранни компоненти). Например, добре установено е, че интерферон-бета е хидрофобен протеин (това е обусловено и от аминокиселинната му секвенция), който може да прилепва неспецифично към страните на епруветките или други повърхности. По-нататък бактериалният интерферон-бета, който не е гликозилиран може да бъде още по-хидрофобен. Следователно, изводите върху възстановяването на гликозилиран интерферон-бета, секретирани от човешки клетки не могат да бъдат приведени към интерферона с бактериален произход.

2. Демонстриране на активността на интерферон-бета

А. Антивирусна активност

Бактериални екстракти от *E.coli* М5219 или К12ΔНІ, съдържащи плазмидите G-pPLa-HFIF-67-12, G-pPLa-HFIF-67-12Δ19, G-pPLc-HFIF-67-8, G-pPLa-HFIF-67-12Δ279 Т, G-

pPLa-HFIF-67-12Δ218MI, G-pPLa-HFIF-67-12ΔMI или G-pPLa-HFIF-67-12Δ19 BX-2, се анализират за антивирусна активност на интерферон-бета. Процедурата за индуцирането и приготвянето на S-100 екстрактите и супернатантите след осмотичен шок са главно както са описани по-горе. 150 мл бактериална култура ($3-6 \times 10^8$ клетки/мл) се използват за експеримента. Всички биологични титри са дадени в \log_{10} единици/мл.

G-pPLa-HFIF-67-12

G-pPLa-HFIF-67-12 се използва за трансформиране на E.coli M5219 и E.coli K12ΔHI и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Всички проби са преципитирани с амониев сулфат, преди да се тестват за антивирусна активност.

	<u>T₂₁</u>	<u>E₁SM</u>
K12ΔHI-G-pPLa-HFIF-67-12(28°C)	<0.2	<1.0
K12ΔHI-G-pPLa-HFIF-67-12(42°C, 90 мин)	0.2/0.5	<1.0/<1.0
M5219-G-pPLa-HFIF-67-12(28°C)	<0.2	<1.0
M5219-G-pPLa-HFIF-67-12(42°C, 90 мин)	0.7/07	<1.0/<1.2

Втората фигура в горната таблица е титърът, определен при повторно анализиране на същата проба. Контролният опит е прибавяне на автентичен интерферон-бета към E.coli HB101-pMS2-7 преди лизиса на клетките и показва, че възстановяването на интерферон-бета в опита е 30%. Следователно ясно е, че при индукция се наблюдава интерферон-бета антивирусна активност в бактериалните лизати. Титрите, тъй като са по-ниско от определеното ниво на E₁SM клетките, показват ясно, че активността на интерферон-бета не се

дължи на замърсяваща бактериална активност. Такава замърсяваща бактериална активност дава стойности поне 2.0 върху E_1SM срещу 0.5 или 0.7 върху T_{21} клетките (вж. контролните експерименти по-горе).

G-pPLa-HFIF-67-12Δ19

G-pPLa-HFIF-67-12Δ19 се използва за трансформиране на E.coli M5219 и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Всички проби са преципитирани с амониев сулфат, както е описано по-горе, преди да се тестват за антивирусна активност. Отново присъствието на антивирусна активност на човешки интерферон бета е разбираемо. Стойността в скобите показва намереното ниво, дължащо се на токсичност на определени проби за човешки клетки в тъканна култура.

i) M5219-G-pPLa-HFIF-67-12Δ19(28°C)

ii) M5219-G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19(42°C, 90 мин, крайна клетъчна плътност = 3×10^8 /мл)

	<u>върху T_{21}</u>	<u>върху E_1SM</u>
i)	<0.5	2.2 (< 2.0)
ii)	2.2(<0.5)	2.2 (< 2.0)

Контролният опит е прибавяне на автентичен интерферон-бета към E.coli HB101-pMS2-7 преди лизиса на клетките и показва, че възстановяването на интерферон-бета в опита е 30%. Високите стойности на T_{21} клетките и отношението на T_{21} към E_1SM показва, че няма значителна замърсяваща бактериална активност (както е обсъждано по-горе) в температурно индуцираните проби.

G-pPLc-HFIF-67-8

Плазмидът G-pPLc-HFIF-67-8 се използва за трансформиране на E.coli M5219 и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Всички проби са преципитирани с амониев сулфат, както е описано по-горе, преди да се тестват за антивирусна активност.

i) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8(28°C)

ii) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8(42°C, 180 мин, крайна клетъчна плътност = 6×10^8 /мл)

	<u>върху T₂₁</u>	<u>върху E₁SM</u>
i)	<0.5	2.2 (< 2.0)
ii)	2.2(<0.5)	2.2 (< 2.0)

Стойността в скобите показва намереното ниво, дължащо се на токсичност. Контролният опит е прибавяне на автентичен интерферон-бета към E.coli HB101-pMS2-7 преди лизиса на клетките и показва, че възстановяването на интерферон-бета в опита е 30%. Отново е ясно, че бактериалният екстракт проявява антивирусна активност на човешки интерферон-бета.

В друг експеримент супернатанта от тези клетки, подложена на осмотичен шок, се изследва за антивирусна активност на интерферон-бета:

i) M5219-G-pPLa-HFIF-67-12Δ19(28°C)

ii) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8(28°C)

iii) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8(42°C, 180 мин, крайна клетъчна плътност = 6×10^8 /мл)

Изследванията се провеждат върху T₂₁ клетки преди и след преципитиране с амониев сулфат. Стойностите в скобите показват границите на определяне.

	<u>преди преципитиране</u>	<u>след преципитиране</u>
i)	<0.2	<0.2
ii)	<0.2	<0.2
iii)	1.5 (<0.2)	0.7(<0.2)

Въстановяването на интерферон-бета е около 10% в контролните експерименти. Контролните лизати не показват забележима активност върху E₁SM. Стойностите, получени за супернатантите, преминали през осмотичен шок, показват, че температурно индуцирания екстракт от M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 притежава антивирусна активност, която не присъствува в неиндуцираните проби. Проба (iii), имаща титър 0.7 log₁₀ единици/мл, след преципитиране с амониев сулфат се поставя при рН 2.2, както е описано по-горе и показва несъществено спадане на активността. Тази стабилност спрямо киселини е особено свойство на интерфероните от тип I, сиреч на интерферон-бета.

G-pPLa-HFIF-67-12Δ279 T

Плазмидът G-pPLa-HFIF-67-12Δ279 T се използва за трансформиране на E.coli M5219 и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Пробите се преципитират с амониев сулфат преди изследването на СРЕ върху T₂₁ клетките. Екстрактът от клетки, индуциран при 42°C, проявява антивирусен титър от 1.5-1.7 log₁₀ единици/мл екстракт.

G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI

Плазмидът G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI се използва за трансформиране на E.coli M5219 и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Пробите се преципитират с амониев сулфат преди изследването на СРЕ върху T₂₁ клетките. Екстрактът от клетки, индуциран при 42°C, проявява анти-вирусен титър от 1.5 log₁₀ единици/мл екстракт.

G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI

Плазмидът G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI се използва за трансформиране на E.coli M5219 и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Пробите се преципитират с амониев сулфат преди изследването на СРЕ върху T₂₁ клетките. Екстрактът от клетки, индуциран при 42°C, проявява анти-вирусен титър от 1.5 log₁₀ единици/мл екстракт.

G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI

Плазмидът G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI се използва за трансформиране на E.coli M5219 и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Пробите се преципитират с амониев сулфат преди изследването на СРЕ върху T₂₁ клетките. Екстрактът от клетки, индуциран при 42°C проявява антивирусен титър от 1.5 log₁₀ единици/мл екстракт.

G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI

Плазмидът G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI се използва за трансформиране на E.coli M5219 и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Пробите се преципитират с амониев сулфат преди изследването на СРЕ върху T₂₁ клетките. Екстрактът от клетки, индуциран при 42°C, проявява анти-вирусен титър от 1.5 log₁₀ единици/мл екстракт.

G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI

Плазмидът G-pPLa-HFIF-67-12 Δ218MI се използва за трансформиране на E.coli M5219 и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Пробите се преципитират с амониев сулфат преди изследването на СРЕ върху T₂₁ клетките. Екстрактът от клетки, индуциран при 42°C, проявява антивирусен титър от 1.5 log₁₀ единици/мл екстракт.

G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI

Плазмидът G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 218MI се използва за трансформиране на E.coli M5219 и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Пробите се преципитират с амониев сулфат преди изследването на СРЕ върху T₂₁ клетките. Екстрактът от клетки, индуциран при 42°C, проявява антивирусен титър от 1.5 log₁₀ единици/мл екстракт.

G-pPLa-HFIF-67-12Δ218MI

Плазмидът G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 218MI се използва за трансформиране на E.coli M5219 и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Пробите се преципитират с амониев сулфат преди изследването на СРЕ върху T₂₁ клетките. Екстрактът от клетки, индуциран при 42°C, проявява антивирусен титър от 1.5 log₁₀ единици/мл екстракт.

G-pPLa-HFIF-67-12ΔMI

Плазмидът G-pPLa-HFIF-67-12 Δ MI се използва за трансформиране на E.coli M5219 и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Пробите се преципитират с амониев сулфат преди изследването на СРЕ върху T₂₁ клетките. Екстрактът от клетки, индуциран при 42°C, проявява антивирусен титър от 2.0 log₁₀ единици/мл екстракт.

G-pPLa-HFIF-67-12Δ19 BX-2

Плазмид G-pPLa-HFIF-67-12 Δ19 BX-2 се използва за трансформиране на E.coli K12ΔHI и S-100 екстракти се приготвят чрез лизис В. Пробите се преципитират с амониев сулфат преди изследването на СРЕ върху T₂₁ клетките. Екстрактът от клетки, индуциран при 42°C, проявява антивирусен титър от 1.7- 2.0 log₁₀ единици/мл екстракт.

б. Неутрализиране на антивирусната активност на интерферона с антитела

Други данни потвърждаващи бактериалната експресия на интерферон-бета са получени чрез експерименти с неутрализиране на антитела. Анти-интерферонов антисерум се получава у кози, имунизирани с 10⁷ единици автентичен интерферон-бета (секретирани от човешки фибробластни клетки) и се пречиства върху стъклени сфери с контролиран размер на порите (A. Billiau et al., по-горе). След като бактериалните екстракти се изследват както е описано по-горе за антивирусна активност, към сходни проби се прибавят серийни разреждания на антисерума, сместа се инкубира за един час при 37°C, прилага се към човешки диплоидни фибробласти T₂₁ и се изследва за антивирусна активност както е описано по-горе. Степента на неутрализиране с антисерум варира от +++ (пълна неутрализация) до - (без неутрализация). Стойността в скобите показва приблизителното разреждане на антисерума за 50% неутрализация.

1) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 (42°C, 180 мин, даващ 2.2 log₁₀ антивирусни единици/мл върху T₂₁ клетки).

2) M5219-G-pPLa-8 (42°C, 180 мин), към който преди лизиса е прибавен интерферон-бета (от човешки фибробласти), даващ $1.7 \log_{10}$ антивирусни единици/мл върху T₂₁ клетки.

разреждане на антисерума	(1)	(2)
10 ⁻³	+++	+++
10 ⁻⁴	+	+++
10 ⁻⁵	<u>±</u> (10 ^{-4.5})	+++
10 ⁻⁶	-	<u>±</u> (10 ⁻⁶)
10 ⁻⁷	-	-

Сходни резултати се получават с екстракти от M5219-G-pPLc-HFIF-67-12 19 (42°C). Разликите в неутрализационния титър между бактериалния интерферон-бета на това изобретение и автентичния интерферон-бета може би се дължат на разлики в антигенността или на специфична интерферонна активност на тези бактериални протеини, родствени на автентичния интерферон-бета, причинени от липса на гликозилиране на бактериалните протеини.

C. Стабилност на антивирусната активност на HuIFN-beta

(1) Действие на топлината

Интерферон-бета, за разлика от интерферон-алфа има необичайното свойство да възстановява антивирусната си активност след варене в 1% SDS, 1% бета-меркаптоетанол, 5M урея (Stewart, W. E. et al., "Distinct Molecular Species of Human Interferon, Requirements for Stabilization and Reactivation of Human Leucocyte and Fibroblast Interferon", J. Gen. Virol., 26, 327-331, (1975)), въпреки че 100% възстановяване обикновено не се получава. За тази цел

бактериалните клетки от 150 мл култура се ресуспендират във буфер за лизис В и се прибавя еднакъв обем 2% SDS, 2% бета-меркаптоетанол и 10 М урея. Сместа се сварява 2 мин и се приготвят S-100 фракции.

i) контрола: M5219-G-pPLa-HFIF-67-12Δ19(28°C)

ii) контрола: 3 log₁₀ единици HuIFN-beta, разтворен в лизис В буфер

iii) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8(42°C, 180 мин, крайна клетъчна плътност = 6 x 10⁸/мл)

Изследванията се провеждат върху T₂₁ клетки. Стойността във скобите показва границите на определяне, дължащи се на свойствена токсичност.

<u>Преди сваряване</u>	<u>След сваряване</u>
i) <1.5	<1.5
ii) 2.2 (<1.5)	2.0 (<0.5)
iii) 3.0 (<2.0)	2.2 (<1.5)

Контролният експеримент показва възстановяване около 10% на активността на интерферон-бета. Няма забележима стойност в паралелните контролни лизати на E₁SM. Тези данни поясняват, че въпреки че само 10% от прибавения в контролния експеримент интерферон-бета се възстановява, то антивирусната активност на интерферон-бета присъствува в екстракта от температурно-индуцирана култура на M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 въпреки това сурово третиране. Всъщност, антивирусната активност, установена след това въздействие, е по-висока в сравнение с тази след лизис В, което показва

възможно прилепване на интерферон-бета към клетъчните компоненти по време на лизиса.

(2) Диализа

Антивирусната активност на интерферон-бета също така не се диализира. Например след диализа срещу PBS за 16 часа при неутрално рН и 4°C антивирусната активност на бактериалните екстракти (\log_{10} единици/мл) се поддържа, макар и с редуциран титър.

- i) M5219-pPLc-HFIF-67-8 (42°C)
- ii) M5219-pPLa-HFIF-67-12Δ19 (42°C)
- iii) IFN-beta в M5219-pPLa-8 (42°C)

<u>Преди диализа</u>	<u>След диализа</u>
i) 2.3	2.3
i) 3	2.3
i) 1.5	1.3
ii) 2.3	1.3
ii) 2.3	2
ii) 2.3	1

Наблюдаваното спадане на активността след диализа може би се дължи на неспецифично прилепване на интерферон-бета към диализните мембрани и т.н.

(3) Преципитиране с амониев сулфат

Антивирусната активност (\log_{10} единици/мл) на бактериалните екстракти на това изобретение се поддържа след преципитиране с 67% процента наситен разтвор на амониев сулфат (2 об. разтвор на амониев сулфат към 1 обем

екстракт), за която концентрация е известно че преципитира човешкия интерферон-бета. След 30 мин върху лед утайката се центрофугира при 12 000 x g за 10 мин и се разтварят в PBS за изследване:

- i) M5219-pPLc-HFIF-67-8 (42°C)
- ii) M5219-pPLa-HFIF-67-12Δ19 (42°C)
- iii) IFN-beta в M5219-pPLa-8 (42°C)

	<u>преди преципитация</u>	<u>след преципитация</u>
i)	2	2
i)	2	2.3
ii)	2	2
iii)	1.3	1.3
iii)	1.5	1.3

(4) Въздействие на рН

Антивирусната активност (\log_{10} единици/мл) на бактериалните екстракти на това изобретение е киселинно-стабилна. Екстрактите или се диализират 15 часа срещу 50 мл глицин-HCl (рН 2.2), след което се диализират 3 часа срещу PBS или се подкисляват с HCl, след което се неутрализират с NaOH. Изследванията се провеждат след отстраняване на преципитата.

- i) M5219-pPLc-HFIF-67-8 (42°C)
- ii) M5219-pPLa-HFIF-67-12Δ19 (42°C)
- iii) IFN-beta в M5219-pPLa-8 (42°C)

преди киселина

i) 2

след киселина

1.3

<i>преди киселина</i>		<i>СЛЕД киселина</i>
i)	0.7	0.7
ii)	2	1
iii)	3	2

d. 2.5-A синтетазна активност

Подлагането на M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 на осмотичен шок (описано по-горе) се изследва за наличие на 2,5-A синтетаза, както е описано по-горе с микротитърни плаки, с изключение на това, че се използват HeLa клетки вместо E₁SM. Получени са следните резултати:

- i) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 (28°C)(вж. по-горе)
- ii) M5219-G-pPLc-HFIF-67-8 (42°C)(вж. по-горе)

Стойностите, отразяващи 2,5-A синтетазната активност, показват радиоактивността на ³²P, инкорпориран в тримерната форма на 2,5-A.

	(измерени (след изваждане импулси) на ендогенния фон)	
1) нетретирани клетки	3342 cpm	0 cpm
2) бактериален екстракт (i): разреждане 1/6	1792 cpm	-1370 cpm
3) бактериален екстракт (ii): разреждане 1/6	6960 cpm	3618 cpm
4) бактериален екстракт (i) + IFN-beta до 1.5 log ₁₀ единици/мл	7037 cpm	3695 cpm
5) вж. 3) но инкубиран с анти IFN-beta антисерум	3950 cpm	608 cpm
6) вж. 4) но инкубиран с		

анти IFN-beta антисерум	2960 cpm	-382 cpm
7) контролен IFN-beta 0.5 log ₁₀ единици/мл	4463 cpm	1120 cpm
8) контролен IFN-beta 1.0 log ₁₀ единици/мл	7680 cpm	4338 cpm
9) контролен IFN-beta 1.5 log ₁₀ единици/мл	13615 cpm	10273 cpm
10) контролен IFN-beta 2.0 log ₁₀ единици/мл	25040 cpm	21698 cpm

Резултатите от изследването на 2,5-А синтетазната активност показват, че супернатантите на температурно-индуцираната M5219-G-pPLc-HFIF-67-8, подложени на осмотичен шок и имащи антивирусна активност също така индуцират 2,5 синтетазната активност, докато нетретираните с висока температура бактериални щамове не я индуцират. Това дублира резултатите от изследването на антивирусната активност.

Степента на стимулиране на 2,5 синтетазата е равна на активността на интерферон-бета, прибавен към контролния лизат (сравни примери (3) и (4)). Използването на концентрационна крива, изведена от примерите 7-10, показва, че като се имат предвид разрежданията, може да се определи активност от 1,7 log₁₀ единици/мл за двете проби (3) и (4), която е сравнима със стойностите на директното антивирусно изследване т.е. 1.5 log₁₀ единици/мл за двете проби. Тази серия от експерименти също така показва, че индукцията на 2,5-А синтетазата може да се неутрализира с антиинтерферон-бета антисерум, както в случая при антивирусното изследване.

е. Антивирусна активност върху други клетъчни линии.
 Екстрактите (i) и (ii) (M5219-G-pPLc-HFIF-67-8) се тестват също за антивирусна активност върху различни клетъчни линии от котешки, миши, маймунски или заешки произход. Те не показват забележима антивирусна активност върху тези клетки, също както и автентичен интерферон-бета, произведен от човешки клетки. Също не е намерена активност върху котешка белодробна клетъчна линия, която е чувствителна към човешки левкоцитен интерферон. Тези резултати дават по-нататъшно доказателство, че производеният от бактерии интерферон-бета показва изключително качества, идентични на тези на интерферон, секретирани от индуцирани човешки фибробластни клетки.

f. Чувствителност към протеази.

Чувствителността на интерферон-бета от бактериални гостоприемници в това изобретение се тества чрез въздействие върху разредени бактериални екстракти с нарастващи количества трипсин за 1 час при 37°C. Антивирусната активност на интерферон-бета се премахва от същите концентрации трипсин, при които се премахва активността на автентичен интерферон-бета, прибавен към инактивиран контролен лизат.

	Крайна точка
	при трип- син (ms/ml)
M5219-pPLa-HFIF-67-12d19 (42°C)(1000 ед/мл)	0.03

M5219-pPLc-HFIF-67-8	(42°C)(1000 ед/мл)	0.03
IFN-beta в M5219-pPLa-8	(42°C)(1000 ед/мл)	0.03
M5219-pPLc-HFIF-67-8	(42°C)(30 ед/мл)	0.03
IFN-beta в M5219-pPLa-8	(42°C)(30 ед/мл)	0.03

3. Идентифициране на активния продукт интерферон-бета

Различни експерименти демонстрират, че пре-HuIFN-beta не е активен и не се превръща от бактериалните клетки или при условията на изследването в активен продукт (няма процесинг). Следователно активността на интерферон-бета, отбелязана в различните бактериални екстракти, описани по-горе вероятно се дължи на процесинг на очакваните слети протеини (напр. човешки интерферон-бета, слят с бета лактамаза, MS2 или бактериална сигнална секвенция) в активен продукт, от бактериите или при условията на изследването.

Не е сигурно, че активният продукт в такива екстракти е зрял HuIFN-beta (зрял HuIFN-beta е продукта от G-pPLa-HFIF-67- Δ 12 MI и G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19 BX-2). Обаче фракционирането на бактериалните екстракти чрез полиакриламид гел електрофореза при денатуриращи условия показва наличието на два активни продукта. Първият от тях има размери около 15000-18000 далтона и би трябвало да отговаря на зрял интерферон-бета. Вторият продукт, който има по-високо молекулно тегло, вероятно е продукт на сливането или е претърпял непълнен процесинг, който притежава активност на интерферон-бета или е продукт, претърпял процесинг до зрял интерферон-бета при условията на изследването. Намирането на аминокиселинната секвенция на различни експресирани продукти при използването на добре позната техника би направило възможно определянето на протеиновите

продукти (ако има такива), които показват активност на интерферон-бета в прибавка на тази на зрелия NuIFN-beta.

ПОДОБРЯВАНЕ НА ДОБИВА И АКТИВНОСТТА НА ПОЛИПЕПТИДИТЕ, ПРОЯВЯВАЩИ АКТИВНОСТ НА ЧОВЕШКИ ИНТЕРФЕРОН-БЕТА, ПОЛУЧЕНИ В СЪОТВЕТСТВИЕ С ТОВА ИЗОБРЕТЕНИЕ.

Нивото на продукцията на протеин се ръководи от три главни фактора: броя на копията на неговите гени в клетката, ефективността, с която тези генни копия се транскрибират, и ефективността, с която те се превеждат. Ефективността на транскрипцията и транслацията (които заедно съставляват експресията) зависи от своя страна от нуклеотидните секвенции, нормално разположени преди желаната кодираща секвенция. Тези нуклеотидни секвенции, или още секвенции, контролиращи експресията, дефинират *inter alia*, мястото при което РНК полимеразата взаимодействува, за да инициира транскрипцията (промоторна секвенция) и при което рибозомите се свързват и взаимодействуват с мРНК (продукта от транскрипцията), за да иницират транслацията. Не всички контролиращи експресията секвенции функционират с еднаква ефективност. Следователно предимство е да се отделят специфичните кодиращи секвенции за желания протеин от съседните им такива и вместо това да се присъединят към други познати контролни секвенции, за да се благоприятствуват по-високи нива на експресия. Ако това се постигне, новополученият ДНК фрагмент може да се вмъкне в плазмид с множество копия или в производно на бактериофаг, за да се повиши броят на генните копия в клетката и по-този начин и добива на експресирания протеин.

Няколко контролиращи експресията секвенции могат да се използват както е описано по-горе. Те включват оператора, промотора и мястото за свързване и взаимодействие с рибозомите (включително секвенции като тази на Shine-Dalgarno) на лактозния оперон на E.coli (lac-оперона), съответстващата секвенция на триптофан-синтезата система на E.coli (trp-системата), главните операторни и промоторни области на фага ламбда (O_{LPL} , който е описан по-горе и O_{RPR}), контролната област на филаментните едноврижни ДНК-фаги или други секвенции, които контролират експресията на гените на прокариотните или еукариотни клетки и техните вируси. Следователно, за подобряване продукцията на определен полипептид в подходящ гостоприемник, генът, кодиращ този полипептид, трябва да бъде получен както е описано и придвижен от рекомбинантната ДНК молекула поблизо до своята предишна контролираща експресията секвенция или под контрола на една от по-горните секвенции. Такива методи са познати в практиката.

Други методи за подобряване ефективността на транслацията включват вмъкването на химически или ензимно приготвени олигонуклеотиди срещу инициращия кодон. Чрез тази процедура се постига по-оптимална първична и вторична структура на мРНК. По-точно секвенцията се аранжира така, че инициращият AUG кодон да се намира в лесно достъпна позиция (т.е. да не е маскиран с вторични структури) или на върха на вилката или в друга едноврижна област. Също така могат да се оптимизират и позицията и секвенцията на по-горе споменатия Shine-Dalgarno сегмент. Важността на общата структура "нагъването" на мРНК е документирано

(D. Iserentant and W. Fiers, "Secondary Structure of mRNA and Efficiency of Translation Initiation", Gene, 9, 1-12(1980).

По-нататъшно повишаване на клетъчния добив от желани продукти зависи от увеличаването на броя на гените, които могат да се използват в клетката. Това може да се постигне чрез инсерция на гена за човешки интерферон-бета (със или без транскрипционните или транслационни контролни елементи) в плазмид с по-висок брой на копията или такъв, който се контролира чрез температура (т.е. който носи мутация, чрез която броят на копията се увеличава, когато се повиши температурата; B. Uhlin et al., "Plasmids with Temperature-dependent Copy Number for Amplification of Cloned Genes and Their Products", Gene, 6, 91-106 (1979)). Алтернативно, повишаване дозата на гена може да се постигне чрез вмъкване на рекомбинантна ДНК молекула, получена по начина, описан по-горе, в умерения бактериофаг ламбда, просто чрез смилане на плаزمид с рестриктази, за да се получи линейна молекула, която после се смесва с рестриктираното фаг ламбда- клониращо средство (т.е. от типа, описан от N.E. Murray et al., "Lambdoid Phages That Simplify the Recovery of In Vitro Recombinants", Mol. Gen. Genet., 150, 53-61 (1977) и N.E. Murray et al., "Molecular Cloning of the DNA Ligase from Bacteriophage T4", J. Mol. Biol., 132, 493-505 (1979)) и рекомбинантната ДНК молекула да се получи чрез инкубиране с ДНК лигаза. Желаният рекомбинантен фаг след това се подбира както преди и се използва като лизогенен за гостоприемника-щам от E.coli.

Особено полезно е ламбда клониращите средства да съдържат температурно-клонираща мутация в репресорния ген cI и супресивна мутация в гена S, продукта от който е

необходим за лизиса на клетката-гостоприемник и гена E, продуктът от който е главният капсиден протеин на вируса. Лизогенните клетки се отглеждат с тази система при относително ниска температура (28°-32°) и после се загряват до по-висока (40°-45°), за да се индуцира изрязването на профага. Удълженият растеж при по-високи температури води до високи нива на продукцията на протеина, който остава в клетките докато те не бъдат лизирани от фаговите генни продукти по нормалния път и докато фаговият генен инсерт не е енкапсидиран, то той остава на разположение за по-нататъшна транскрипция. Изкуственият лизис на клетките след това освобождава желанния продукт с висок добив. Тъй като при това приложение също се използва ламбда репресорна система за контролиране на експресията може би е необходимо да се контролира изрязването на профага и следователно броя на генните копия чрез хетероимунна контролна област, т.е. произхождаща от ламбдоидния фаг 21.

Трябва да се разбира, че полипептидите, проявяващи активност на интерферон-бета (получени в съответствие с това изобретение) могат да се приготвят под форма на слети протеини, т.е. свързани към прокариотния N-краен сегмент, направляващ екскрецията, или под формата на проинтерферон (т.е. стартиращи със сигнална секвенция на интерферон, която може да се откачи по време на екскрецията) или като зрял интерферон (последния е удобен, тъй като зрелият фибробластен интерферон стартира с метионин, аминокиселина, използвана за инициране на транслацията. Добивът от тези различни форми полипептиди може да се подобри чрез използване на всяка или на комбинация от

процедурите, дискутирани по-горе. Също така могат да се заместят различни или всички кодони, използвани в настоящата ДНК секвенция. Те могат да кодират аминокиселини идентични на тези, кодирани от кодоните, които заместват, но да дават по-висок добив на полипептид. Алтернативно, смяната на един или няколко кодони, водещи до смяна на кодираната аминокиселина или до по-дълъг или по-къс сроден на NuIFN-beta полипептид, може да промени неговите свойства в полезна посока (като повишаване на стабилността, разтворимостта, антивирусната активност, 2,5-А синтетазната активност или специфичния обхват на гостоприемника).

Накрая, активността на полипептидите, получени чрез рекомбинантна ДНК на това изобретение, може да се подобри чрез фрагментиране, модифициране или дериватизиране на ДНК последователностите или полипептидите на настоящото изобретение по добре познати методи, без да се отдалечаваме от обхвата на изобретението.

ИДЕНТИФИЦИРАНЕ НА ХРОМОЗОМАЛНИТЕ ГЕНИ, КОДИРАЩИ ЧОВЕШКИ ИНТЕРФЕРОН-БЕТА

Колекция от хибридни фаги, произхождащи от фетална, човешка, хромозомална ДНК, генерирани чрез частично смилане с HaeIII и AluI, и присъединени с EcoRI линкери към lambda Charon 4A-рамена е приготвена от R. M. Lawn et al., Cell, 15, pp. 1157-74 (1978). Тази генна банка е скринирана с *in situ* метод (W. D. Benton and R. W. Davis, Science, 196, pp. 180-82 (1977)); T. Maniatis et al., Cell, 15, pp. 687-701 (1978)); използвайки като сонда ³²P маркиран инсерт, сръзан с TaqI-BglII рестрикция от рHFIF-21.* Един хибридационенно-

позитивен фагов клон се изолира от 600000 плаки чрез повтарящо се речистване на плаките, Т. Maniatis *et al.* по-горе. Тази плака се обозначава λ CN4A-gHFIF-1. Рестрикционният анализ показва, че тя съдържа 16.3 Кб човешка ДНК.

EcoRI смилането на λ CN4A-gHFIF-1 генерира в прибавка към λ Charon 4A-рамената 8 инсертни фрагмента 4.6, 3.5, 2.4, 1.9, 1.3, 1.2, 0.8 и 0.6 Кб дължина. След Southern блотинг, само 1.9 Кб фрагмента хибридизира към TaqI-BglII фрагмента от рHFIF-21.

1.9 Кб фрагмента се клонира отново директно върху EcoRI участъка на рBR325 (производно на рBR322, което носи маркер за резистентност към хлорамфеникол, съдържащ единично EcoRI място). След лигиране на 0.6 мкг λ CN4A-gHFIF-1, смляна с EcoRI към 100ng рBR325 и трансформиране в E.coli HB101, се подбират няколко клона. Само тези, които съдържат 1.9 Кб фрагмента, хибридизират към кДНК сондата на интерферон-бета. Този клон се обозначава като р(325)-gHFIF-4.

Сравнението на рестрикционния фрагмент, произлизащ от рHFIF-21 и р(325)-gHFIF-4, показва, че няма намесващи се последователности в хромозомалния клон и ДНК информацията, носена от клона е идентична с тази на рHFIF-21.

Идентифицирането и изолирането на хромозомална ДНК, кодираща човешки интерферон-бета, дава възможност за трансформиране на подходящ гостоприемник с тази ДНК и експресиране на човешки интерферон-бета от него. Такова асоцииране има предимство, тъй като различни сигнали, асоциирани с хромозомалната ДНК, присъствуват в такъв клон. Тези сигнали след това ще могат да дадат по-високи

добиви при експресията и вероятно при постекспресионния процесинг на полипептида, кодиран от кодиращата порция на хромозомалната ДНК.

Микроорганизмите и рекомбинантните ДНК молекули, получени чрез процесите, описани тук, са заверени чрез култури, депозириани в немската микробна колекция (DSM), Гьотинген, Германия на 2. април 1980, и идентифицирани като HFIF A-C:

A: E.coli HB101 (G-pBR322(Pst)/HFIF3)

B: E.coli HB101 (G-pBR322(Pst)/HFIF6)

C: E.coli HB101 (G-pBR322(Pst)/HFIF7)

Тези култури са получили ДЕПОЗИТЕН № DSM 1791-1793 респективно. Те също са заверени чрез култури, депозириани в DSM на 5. юни 1980 и са определени като HFIF-D до G:

D: E. coli M5219 (G-pPLa-HFIF-67-12)

E: E. coli K12ΔHI (G-pPLa-HFIF-67-12)

F: E. coli M5219 (G-pPLa-HFIF-67-12Δ19)

G: E. coli M5219 (G-pPLc-HFIF-67-8)

Тези култури са обозначени с DSM номера 1851-1854 респективно. И културите, депозириани в американската колекция за типизиране на култури ATCC, Rockville, Maryland на 26. февруари 1981 се идентифицират като HFIF H до I:

H: E. coli M5219 (-pPLa-HFIF-67-12ΔMI)

I: E. coli HB101 (p[325]-gHFIF-4)

Тези култури са получили ДЕПОЗИТНИ номера ATCC 31824 и 31825.

Тъй като тук представяме няколко от съществените форми на изобретението, то е ясно, че нашата базова конструкция може да се промени, за да се получат нови форми, които да

използват методите и съставните части на това изобретение. Следователно, обхватът на това изобретение трябва да бъде дефиниран с претенции, които ние прилагаме тук, вместо специфичните форми, които представихме до тук по пътя на примерите.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. Рекомбинантна ДНК молекула, способна да индуцира в едноклетъчен гостоприемник полипептид, проявяващ имунологична или биологична активност на човешки интерферон-бета. Споменатата ДНК молекула се състои от :

(a) ДНК инсерти от G-pPLa-HFIF-67-12 (HincII-Sau3AI), G-pPLa-HFIF-67-12 Δ 19(HincII-Sau3AI) и G-pPLa-HFIF-67-8 (HincII-Sau3AI), носени от микроорганизми, идентифицирани с входящи номера DSM 1851-1854 респективно.

(b) ДНК последователности, които хибридизират с някои от по-горе изброените инсерти и

(c) ДНК последователности, които са дегенерати като резултат от генетичния код на ДНК инсерти и секвенции, дефинирани в (a) и (b) и които при експресия кодират полипептиди, имащи същата аминокиселинна секвенция, споменатата ДНК е оперативно свързана към контролираща експресията последователност в споменатата рекомбинантна ДНК молекула.

2. Рекомбинантна ДНК молекула съгласно претенция 1, в която указаната ДНК секвенция (b), хибридираща към ДНК-инсерта (a) е ДНК инсерт от G-pPLa-HFIF-67-12 Δ M1 (HincII-Sau3AI), носен от микроорганизъм, идентифициран с входящ номер ATCC 31824.

3. Рекомбинантна ДНК молекула съгласно претенция 1, в която указаната ДНК секвенция (b), хибридираща към ДНК-инсерта (a), е ДНК инсерт от p[325]-gHFIF-4 [EcoRI], носен от микроорганизъм, идентифициран с входящ номер ATCC 31825.

4. Рекомбинантна ДНК молекула съгласно претенции 1 до 3,

В която споменатата ДНК секвенция е избрана от ДНК секвенция с формула:

```

ATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAATTGCTCTCCTGTTGTGCTTCTCCACTACAG
CTCTTCCATGAGCTACAACCTTGCTTGGATTCCCTACAAGAAGCAGCAATTTTCA
GTGTCAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGCAC
10  AGGATGAACCTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGG
AGGACGCCGCAATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAG
ACAAGATTCATCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCTCCTGGCT
AATGTCATCATCAGATAAACCATCTGAAGACAGTCCCTGGAAGAAAACTGGAGA
15  AAGAAGATTTCAACAGGGGAAAACTCATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATTA
TGGGAGGATTTGCAATTAACCTGAAGGCCAAGGAGTACAGTCACTGTGCCTGGACC
ATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTTACTTCATTAACAGACTTACAGGTT
ACCTCCGAAAC, and
ATGAGCTACAACCTTGCTTGGATTCCCTACAAGAAGCAG
CAATTTTCAGTGTCAAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGC
20  CTCAAGCACAGGATGAACCTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGT
TCCAGAAGGAGGACGCCGCAATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGC
TATTTTCAGACAAGATTCATCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAAC
CTCCTGGCTAATGTCATCATCAGATAAACCATCTGAAGACAGTCCCTGGAAGAAA
AACTGGAGAAAGAAGATTTCAACAGGGGAAAACTCATGAGCAGTCTGCACCTGAA
25  AAGATATTATGGGAGGATTTGCAATTAACCTGAAGGCCAAGGAGTACAGTCACTGT
GCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTTACTTCATTAACAGAC
TTACAGGTTACCTCCGAAAC.

```

5. Рекомбинантна ДНК молекула съгласно претенции 1 до 4, в която споменатата контролираща експресията секвенция е избрана от lac-системата, beta-lac-системата, trp-системата, главната операторна и промоторна област на ламбда фага, контролната област на fd-покриващия протеин и други последователности, които контролират експресията на прокариотни и еукариотни клетки и техни вируси.

6. Рекомбинантна ДНК молекула, съгласно някои от претенциите от 1 до 5, избрана от G-pPLa-HFIF-67-12, G-pPLa-HFIF-67-12 19 и G-pPLa-HFIF-67-8, като указаната рекомбинантна ДНК молекула е носена от микроорганизми, идентифицирани с депозитни №№ DSM 1851-1854 респективно.

7. Рекомбинантна ДНК молекула, съгласно претенции 1 до 5. Споменатата рекомбинантна ДНК молекула е G-pPLa-HFIF-67-12 M1 , носена от микроорганизъм, идентифициран с ДЕПОЗИТЕН № АТСС 31824.
8. Едноклетъчен гостоприемник, трансформиран поне с една рекомбинантна ДНК молекула, съгласно всяка от претенциите от 1 до 7.
9. Трансформиран гостоприемник съгласно претенция 8, избран от E.coli M5219 (G-pPLa-HFIF-67-12)(DSM 1851), E.coli K12 HI (G-pPLa-HFIF-67-12)(DSM 1852), E.coli M5219 (G-pPLa-HFIF-67-12 19)(DSM 1853), E.coli M5219 (G-pPLa-HFIF-67-8)(DSM 1854), и E.coli K12 HI (G-pPLa-HFIF-67-8).
10. Трансформиран гостоприемник, съгласно претенция 8, избран от E.coli M5219 (G-pPLa-HFIF-67-12 M1)(АТСС 31824).
11. Метод за трансформиране на едноклетъчен гостоприемник, съдържащ етап на вмъкване в гостоприемника на рекомбинантна ДНК молекула, съгласно която и да е от претенциите 1 до 7.
12. Метод за получаване на полипептид, проявяващ имунологична или биологична активност на човешки интерферон-бета, съдържащ етапите на трансформиране на едноклетъчен гостоприемник с рекомбинантна ДНК молекула съгласно която да е от претенциите от 1 до 7 и култивиране на гостоприемника.
13. Метод за получаване на полипептид, проявяващ имунологична или биологична активност на човешки интерферон-бета, съдържащ етап на култивиране на едноклетъчен организъм, който е трансформиран с рекомбинантна ДНК молекула, съгласно която да е от претенциите от 1 до 7.
14. Метод съгласно претенции 12 или 13, в който полипептида, проявяващ имунологична или биологична активност

на човешки интерферон-бета, е избран от полипептидите на формулата:

Met-Thr-Asn-Lys-Cys-Leu-Leu-Gln-Ile-Ala-Leu-Leu-Leu-
 Cys-Phe-Ser-Thr-Thr-Ala-Leu-Ser-Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-
 Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-
 Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-
 Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-
 Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-
 Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-
 Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-
 Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-
 His-Leu-Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-
 Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-
 Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-
 Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-
 Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-
 Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn, and

Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-Leu-Gly-
 Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-
 Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-
 Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-
 Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-
 Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-
 Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-
 Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-
 Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-
 Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-
 Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-
 Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-
 Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-
 Leu-Arg-Asn.

15. Метод за получаване на полипептид, проявяващ имунологична или биологична активност на човешки интерферон-бета, съдържащ етап на култивиране на едноклетъчен организъм, който е трансформиран с ДНК последователност, избрана от ДНК последователностите на формула

ATGACCAACAAGTGTCTCCTCCAAATTGCTCTCCTGTTGTGCTTCTCCACTACAG
 CTCTTTCCATGAGCTACAACCTTGCTTGGATTCTTACAAGAAGCAGCAATTTTCA
 GTGTCAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGCCTCAAGCAC
 AGGATGAACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGTTCCAGAAGG
 AGGACGCCGATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGCTATTTTCAG
 ACAAGATTTCATCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAACCCTCCTGGCT
 AATGTCATCATCAGATAAACCATCTGAAGACAGTCTGGAAGAAAAACTGGAGA
 AAGAAGATTTACCAGGGGAAAACTCATGAGCAGTCTGCACCTGAAAAGATATA
 TGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGAGTACAGTCACTGTGCCTGGACC
 ATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTTACTTCATTAACAGACTTACAGGTT
 ACCTCCGAAAC, and

ATGAGCTACAACCTTGCTTGGATTCTTACAAGAAGCAG
 CAATTTTCAGTGTGAGAAGCTCCTGTGGCAATTGAATGGGAGGCTTGAATACTGC
 CTCAAGCACAGGATGAACTTTGACATCCCTGAGGAGATTAAGCAGCTGCAGCAGT
 TCCAGAAGGAGGACGCCGATTGACCATCTATGAGATGCTCCAGAACATCTTTGC
 TATTTTCAGACAAGATTCATCTAGCACTGGCTGGAATGAGACTATTGTTGAGAAC
 CTCTGGCTAATGTCTATCATCAGATAAACCATCTGAAGACAGTCTGGAAGAAA
 AACTGGAGAAAAGAAGATTTACCAGGGGAAAACTCATGAGCAGTCTGCACCTGAA
 AAGATATTATGGGAGGATTCTGCATTACCTGAAGGCCAAGGAGTACAGTCACTGT
 GCCTGGACCATAGTCAGAGTGGAAATCCTAAGGAACTTTTACTTCATTAACAGAC
 TTACAGGTTACCTCCGAAAC,

16. Методът от претенция 15, в който указания полипептид, проявяващ имунологична или биологична активност на човешки интерферон-бета, е избран от полипептидите на формула

Met-Thr-Asn-Lys-Cys-Leu-Leu-Gln-Ile-Ala-Leu-Leu-Leu-
 Cys-Phe-Ser-Thr-Thr-Ala-Leu-Ser-Met-Ser-Tyr-Asn-Leu-
 Leu-Gly-Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-
 Lys-Leu-Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-
 Leu-Lys-Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-
 Lys-Gln-Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-
 Thr-Ile-Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-
 Arg-Gln-Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-
 Val-Glu-Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-
 His-Leu-Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-
 Asp-Phe-Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-
 Lys-Arg-Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-
 Lys-Glu-Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-
 Glu-Ile-Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-
 Gly-Tyr-Leu-Arg-Asn, and

Met-SerTyr-Asn-Leu-Leu-Gly-
 Phe-Leu-Gln-Arg-Ser-Ser-Asn-Phe-Gln-Cys-Gln-Lys-Leu-
 Leu-Trp-Gln-Leu-Asn-Gly-Arg-Leu-Glu-Tyr-Cys-Leu-Lys-
 Asp-Arg-Met-Asn-Phe-Asp-Ile-Pro-Glu-Glu-Ile-Lys-Gln-
 Leu-Gln-Gln-Phe-Gln-Lys-Glu-Asp-Ala-Ala-Leu-Thr-Ile-
 Tyr-Glu-Met-Leu-Gln-Asn-Ile-Phe-Ala-Ile-Phe-Arg-Gln-
 Asp-Ser-Ser-Ser-Thr-Gly-Trp-Asn-Glu-Thr-Ile-Val-Glu-
 Asn-Leu-Leu-Ala-Asn-Val-Tyr-His-Gln-Ile-Asn-His-Leu-
 Lys-Thr-Val-Leu-Glu-Glu-Lys-Leu-Glu-Lys-Glu-Asp-Phe-
 Thr-Arg-Gly-Lys-Leu-Met-Ser-Ser-Leu-His-Leu-Lys-Arg-
 Tyr-Tyr-Gly-Arg-Ile-Leu-His-Tyr-Leu-Lys-Ala-Lys-Glu-
 Tyr-Ser-His-Cys-Ala-Trp-Thr-Ile-Val-Arg-Val-Glu-Ile-
 Leu-Arg-Asn-Phe-Tyr-Phe-Ile-Asn-Arg-Leu-Thr-Gly-Tyr-
 Leu-Arg-Asn.

17. Съединение за третиране на човешки вируси, третиране на човешки тумори или рак или за имуномодулиране, което съдържа като единствен интерферон бета полипептид, получен съгласно една от претенциите 12-16.

18. Използуване като единствен интерферон-бета на полипептид, получен съгласно една от претенциите 12 до 16 за получаване на съединение, с което да се третират човешки вируси, човешки тумори или рак или за имуномодулиране.

19. Рекомбинантна ДНК молекула, способна да индуцира експресия в едноклетъчен гостоприемник полипептид, проявяващ имунологична или биологична активност на човешки интерферон-бета, реално, както е описан тук чрез примери.

20. Едноклетъчен гостоприемник, трансформиран с поне една рекомбинантна ДНК молекула, както е дефиниран в претенция 19.

21. Метод за трансформиране на едноклетъчен гостоприемник с рекомбинантна ДНК молекула, както е дефинирано от коя да е от претенции 1-7 и 19, по същество, както е описан чрез примери.
22. Трансформиран гостоприемник, когато е получен по метод, съгласно претенции 11 или 21.
23. Метод за получаване на полипептид, проявяващ имунологична или биологична активност на човешки интерферон-бета, по същество, както е описан чрез примери.
24. Полипептид, който е получен по методите, както е описано във всяка една от претенциите 12-16 и 23, по същество, както е описан по емпиричен път.
25. Използуването на полипептид, получен съгласно която и да е от претенциите 12-16 и 23, в препарати, медикаменти за третиране на човешки вируси, рак и за имуномодулиране.

Приложение: 13 фигури

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Ст. Стефанова

Редактор: Р. Николова

Пор.

Тираж: 40 ЗС

FIG. 1

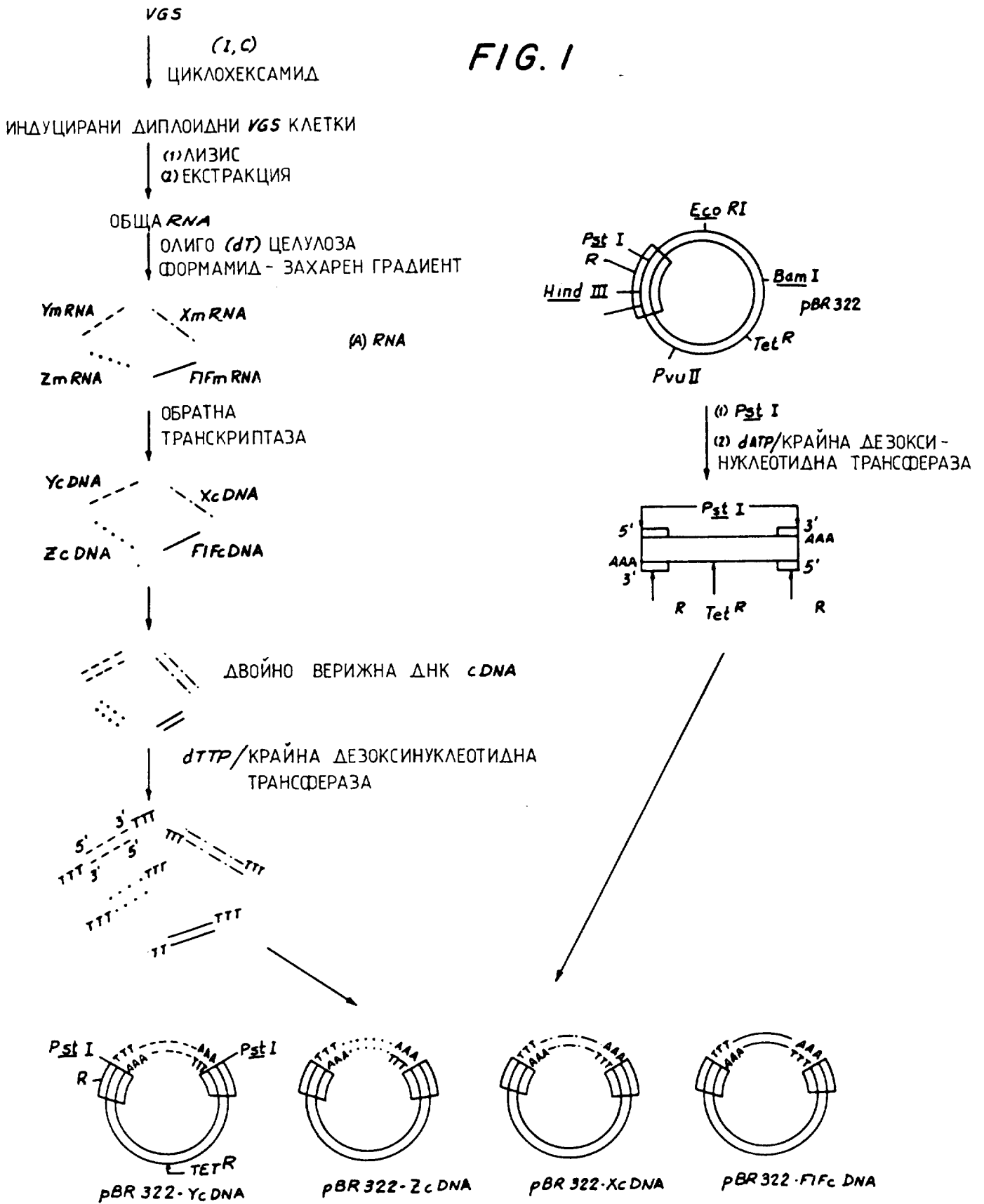


FIG. 2

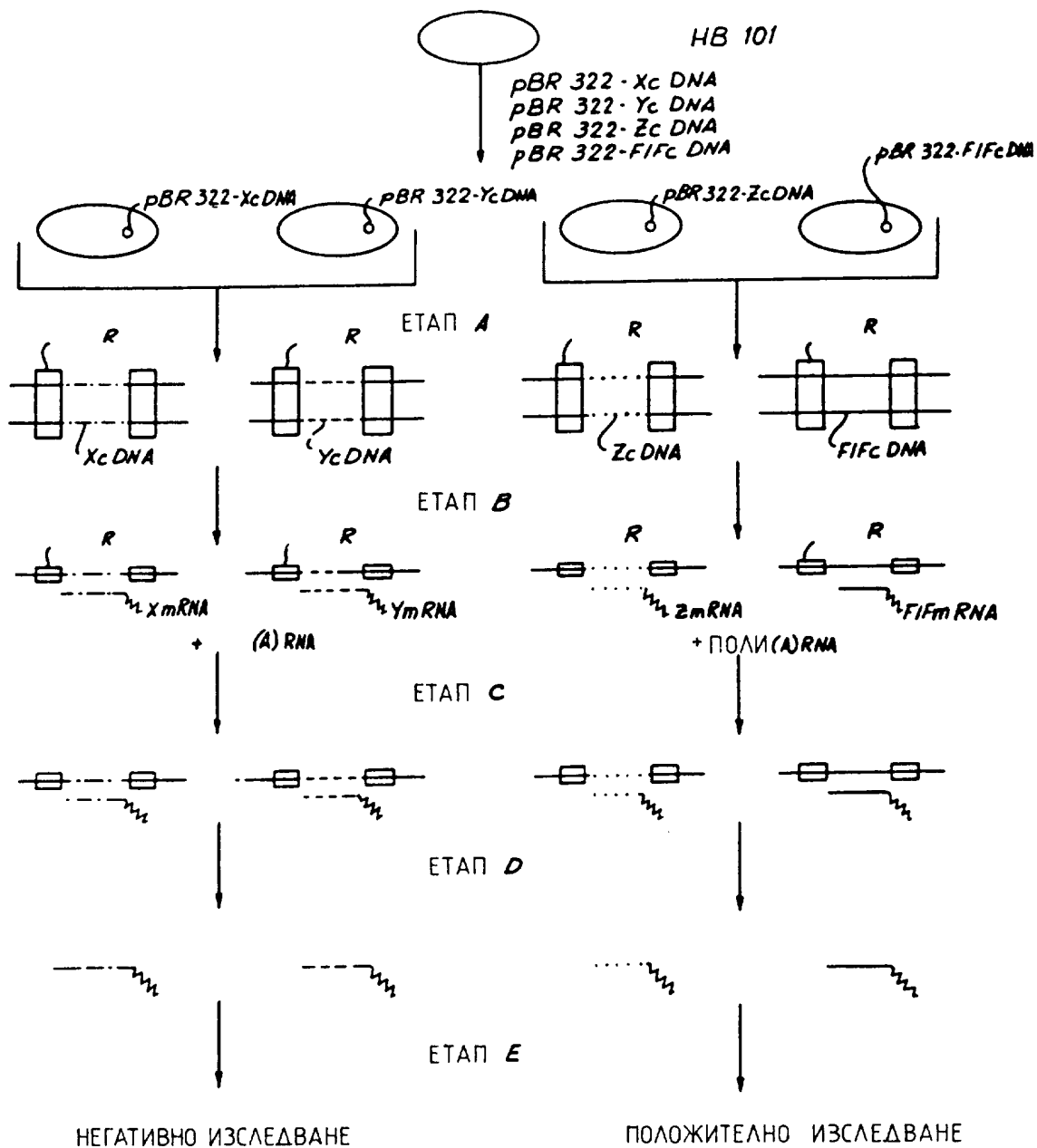


FIG.3



ОБЛЪЧВАНЕ
С Х-ЛЪЧИ

НЕГАТИВЕН ОТГОВОР



^{32}P -*pHFIF1-Hinf I*
ФРАГМЕНТ



ОБЛЪЧВАНЕ
С Х-ЛЪЧИ

ПОЗИТИВЕН ОТГОВОР

⁻²⁰
 MET-THR-ASN-LYS-CYS-LEU-LEU-GLN-ILE-ALA-LEU-LEU-⁻¹⁰
 GCAA CCTTTCGAAG CCTTTGCTC GGCACAACAG GTAGTAGGG ACACGTGTTGG TGTGTTGAC ATG,ACC,AAC,AAG,TGT,CTC,CTC,CAA,ATT,GCT,CTC,CTG,100
⁻¹ ⁺¹
 LEU-CYS-PHE-SER-THR-THR-ALA-LEU-SER-MET-SER-TYR-ASN-LEU-LEU-GLY-PHE-LEU-GLN-ARG-SER-SER-ASN-PHE-GLN-CYS-GLN-LYS-LEU-LEU-²⁰
 TTG,TGC,ITC,ICC,ACT,ACA,GCT,CTT,ICC,ATG,AGC,TAC,AAC,TTG,CIT,GGG,TTG,CTA,CAA,AGA,AGC,AGC,AAAT,TTT,CAG,TGT,CAG,AAG,CTC,CTG,190
³⁰ ⁴⁰
 TRP-GLN-LEU-ASN-GLY-ARG-LEU-GLU-TYR-CYS-LEU-LYS-ASP-ARG-MET-ASN-PHE-ASP-ILE-PRO-GLU-GLU-ILE-LYS-GLN-LEU-GLN-PHE-GLN-⁵⁰
 TGG,CAA,TTG,AAT,GGG,AGG,CTT,GAA,TAC,TGC,CTC,AAG,GAC,AGG,ATG,AAC,TTT,GAC,ATC,CCT,GAG,GAG,ATT,AAG,CAG,CTG,CAG,CAG,TTT,CAG,280
⁶⁰ ⁷⁰
 LYS-GLU-ASP-ALA-ALA-LEU-THR-ILE-TYR-GLU-MET-LEU-GLN-ASN-ILE-PHE-ARG-GLN-ASP-SER-SER-SER-THR-GLY-TRP-ASN-GLU-⁸⁰
 AAG,GAG,GAC,GCC,GCA,TTG,ACC,ATC,TAT,GAG,ATG,CTC,CAG,AAC,ATC,TTT,GCT,ATT,TTT,AGA,CAA,GAT,TCA,TCT,AGC,ACT,GGC,TGG,AAT,GAG,370
⁹⁰ ¹⁰⁰
 THR-ILE-VAL-GLU-ASN-LEU-ALA-ASN-VAL-TYR-HIS-GLN-ILE-ASN-HIS-LEU-LYS-THR-VAL-LEU-GLU-GLU-LYS-LEU-GLU-LYS-GLU-ASP-PHE-¹¹⁰
 ACT,ATT,GTT,GAG,AAC,CTC,CTG,GCT,AAT,GTC,TAT,CAT,CAG,ATA,AAC,CAT,CTG,AAG,ACA,GTC,CTG,GAA,GAA,AAA,CTG,GAG,AAA,GAA,GAT,TTT,460
¹²⁰ ¹³⁰
 THR-ARG-GLY-LYS-LEU-MET-SER-SER-LEU-HIS-LEU-LYS-ARG-TYR-TYR-GLY-ARG-ILE-LEU-HIS-TYR-LEU-LYS-ALA-LYS-GLU-TYR-SER-HIS-CYS-¹⁴⁰
 ACC,AGG,GGG,AAA,CTC,ATG,AGC,AGT,CTG,CAC,CTG,AAA,AGA,TAT,TAT,GGG,AGG,ATT,CTG,CAT,TAC,CTG,AAG,GCC,AAG,GAG,TAC,AGT,CAC,TGT,550
¹⁵⁰ ¹⁶⁰
 ALA-TRP-THR-ILE-VAL-ARG-VAL-GLU-ILE-LEU-ARG-ASN-PHE-TYR-PHE-ILE-ASN-ARG-LEU-THR-GLY-TYR-LEU-ARG-ASN
 GCC,TTG,ACC,ATA,GTC,AGA,GTG,GAA,ATC,CTA,AGG,AAC,TTT,TAC,TTT,ATT,AAC,AGA,CTT,ACA,GGT,TAC,CTC,CGA,AAC,TGA AGATCTCCTA GCCTG643
 TGCCT CTGGGACTGG ACAATTGCTT CAAGCATTCT TCAACCAGCA GATGCTGTTT AAGTGACTGA TGGCTAATGT ACTGCATATG AAAGGACACT AGAAGATTTT GAAAT 753
 TTTTA TAAATTATG AGTTATTTT ATTTATTTAA ATTTTATTTT GGAAATAAATTTTGG TGCAAAAGTC AAAAAAAA_n ...

FIG. 4

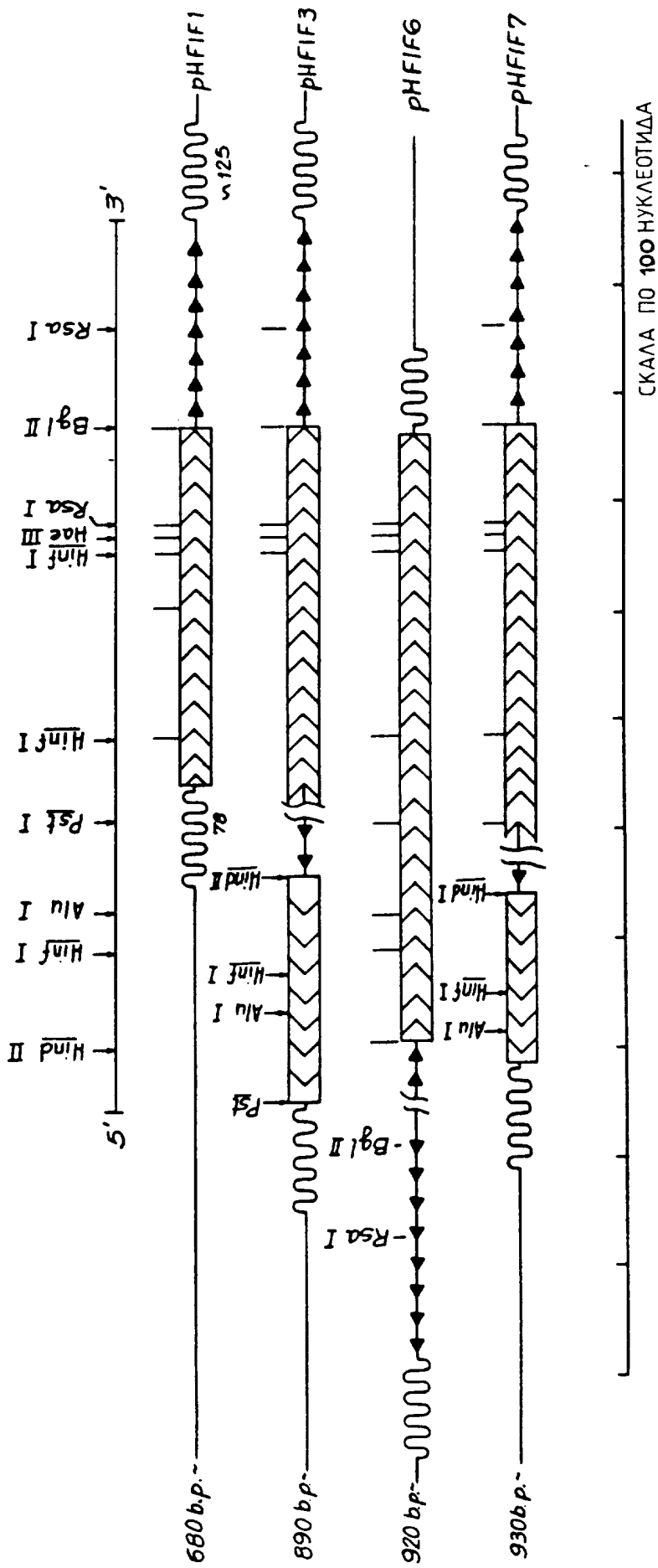


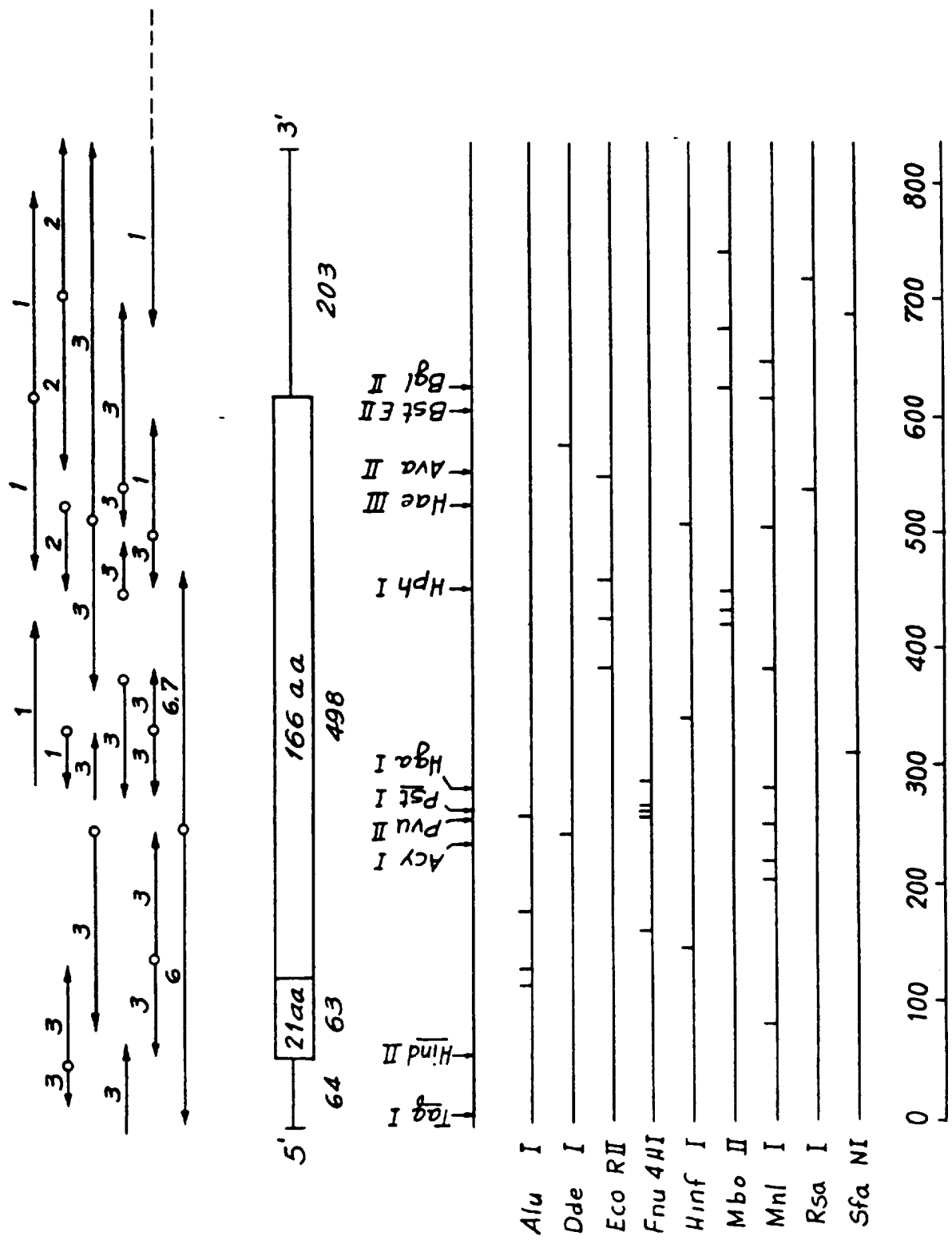
FIG. 5

АМИНОКИСЕЛИНЕН СЪСТАВ НА ЧОВЕШКИ
ФИБРОБЛАСТЕН ИНТЕРФЕРОН

АМИНО- КИСЕЛИНА	СЪСТАВ		
	ДИРЕКТЕН АНАЛИЗ ПО TAN ET AL	ДИРЕКТЕН АНАЛИЗ ПО KNIGHT ET AL	ИЗВЕДЕНА ОТ НУКЛЕОТИДНА ПОСЛЕДОВАТЕЛНОСТ
ASP	20.6	18.9	5
ASN			12
THR	8.0	6.8	7
SER	11.7	10.5	9
GLU	27.5	27.0	13
GLN			11
PRO	4.4	2.7	1
GLY	5.4	7.8	6
ALA	9.3	10.0	6
CYS	N.D.	1.7	3
VAL	7.9	6.0	5
MET		2.9	4
ILE	10.0	9.0	11
LEU	26.9	20.4	24
TYR	3.2	7.5	10
PHE	7.7	9.4	9
HIS	4.6	4.9	5
LYS	12.3	11.6	11
ARG	8.6	10.9	11
TRP	0.0	1.0	3
ВСИЧКО:	168	169	166

FIG. 6

FIG. 7



ПОРЕДЕН НОМЕР НА НУКЛЕОТИДИТЕ

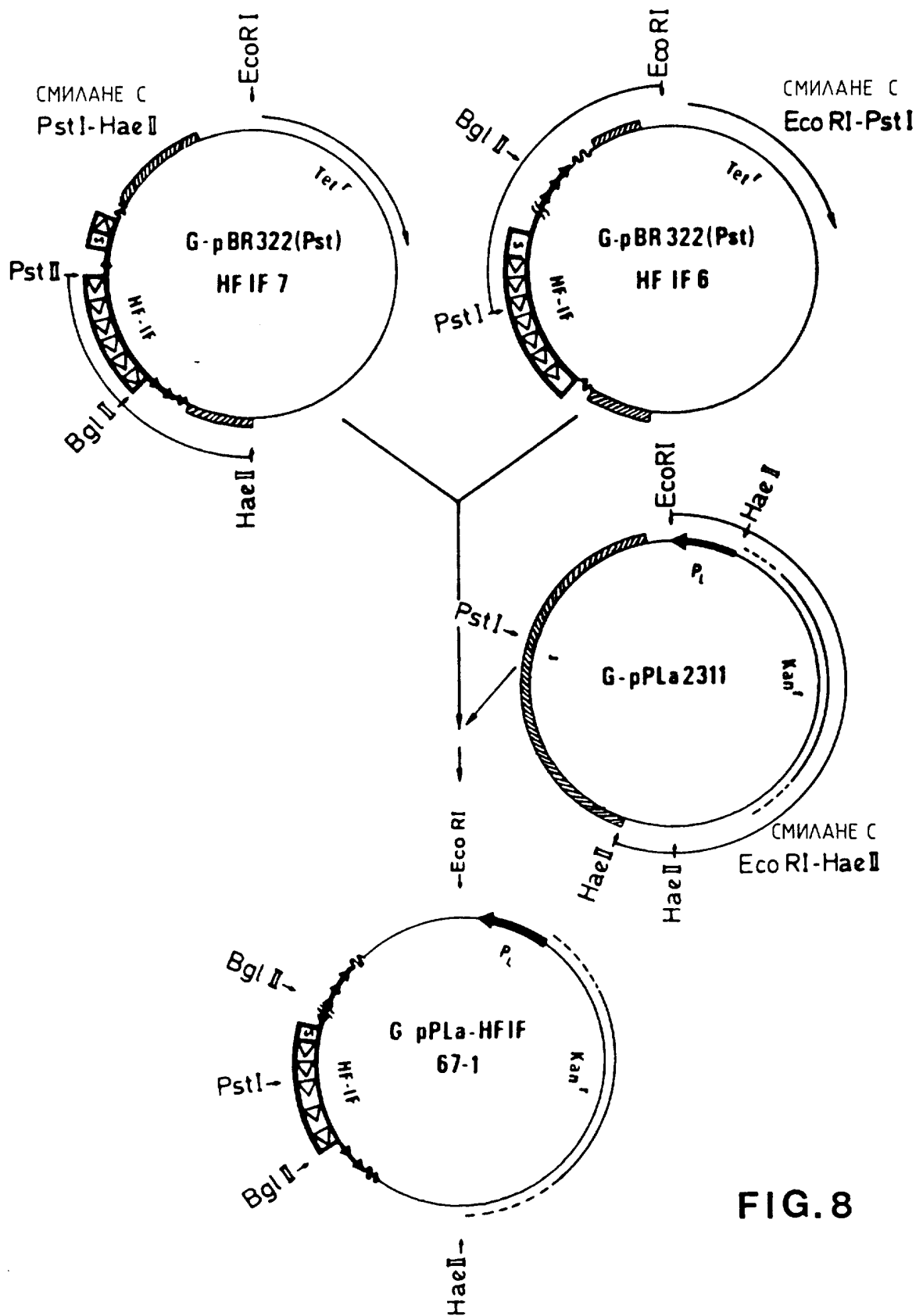


FIG. 8

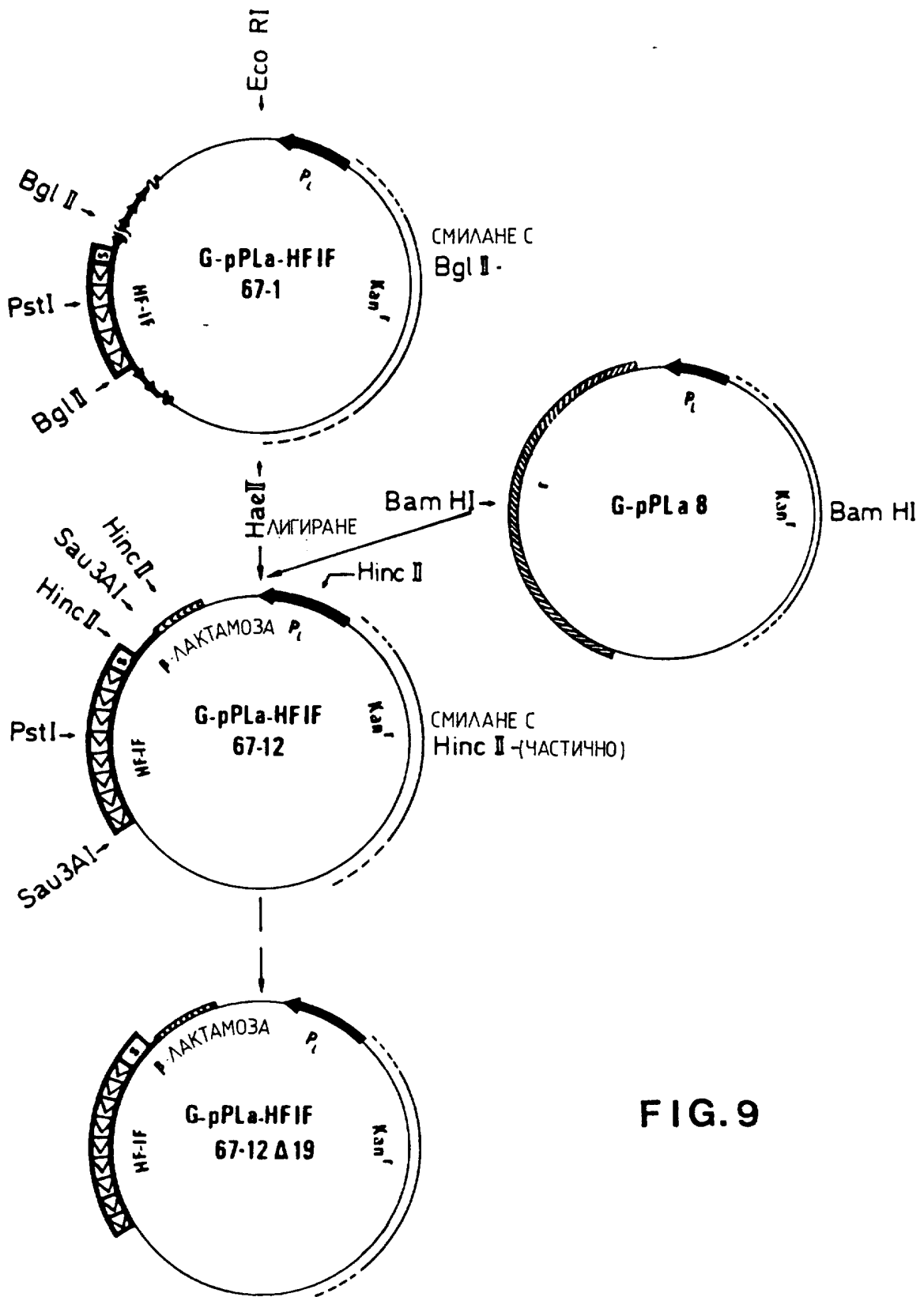


FIG. 9

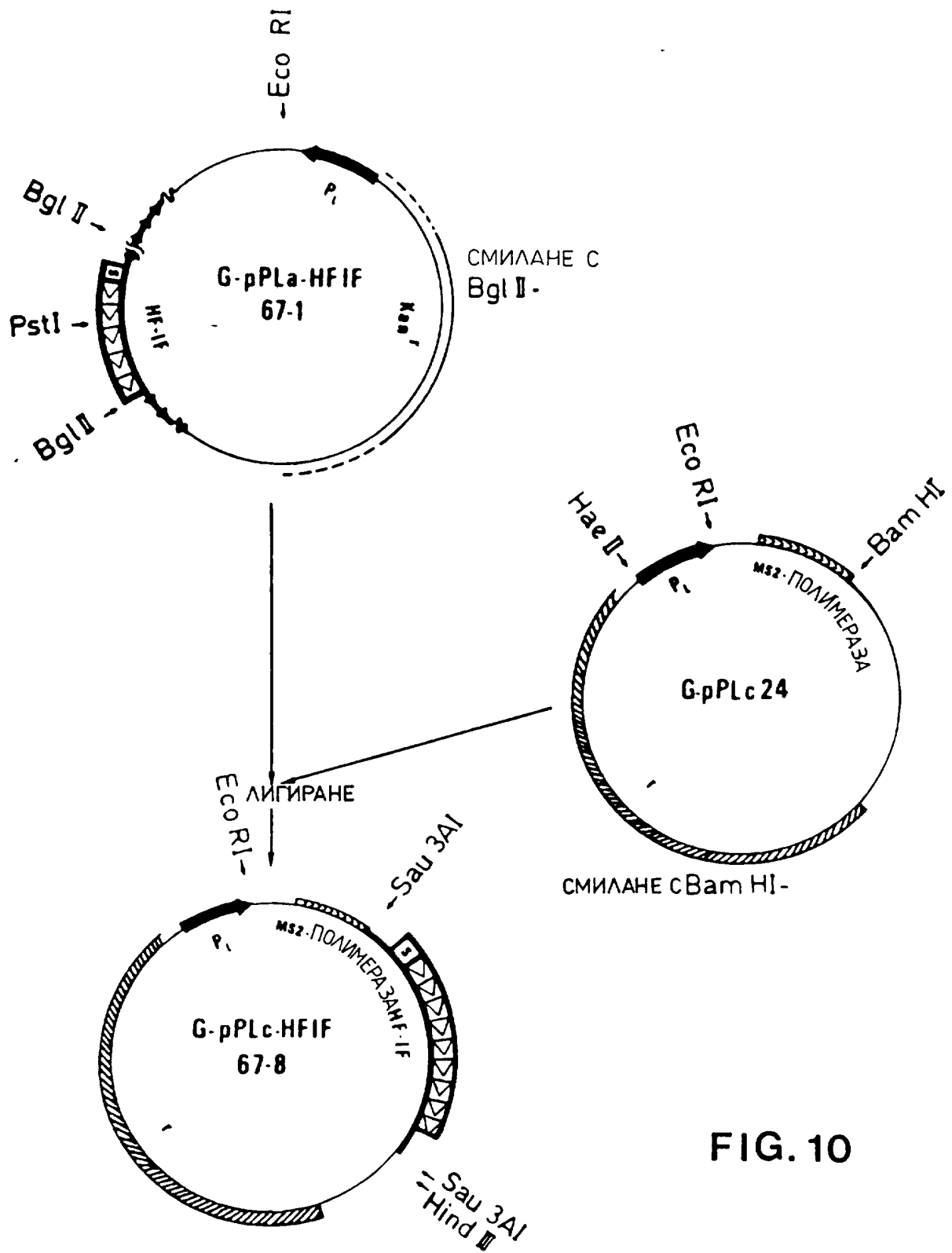


FIG. 10

FIG. 11

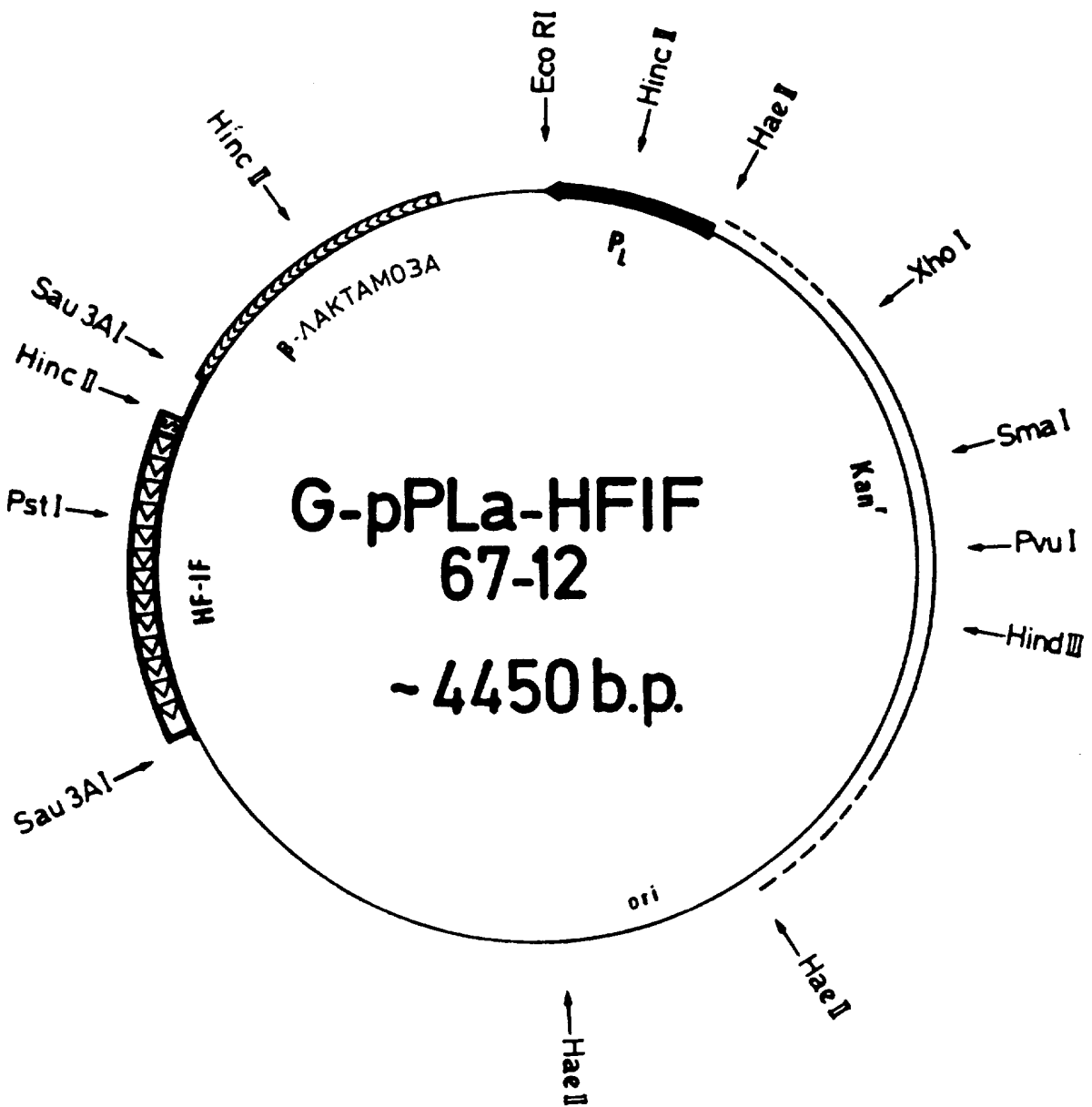


FIG.12

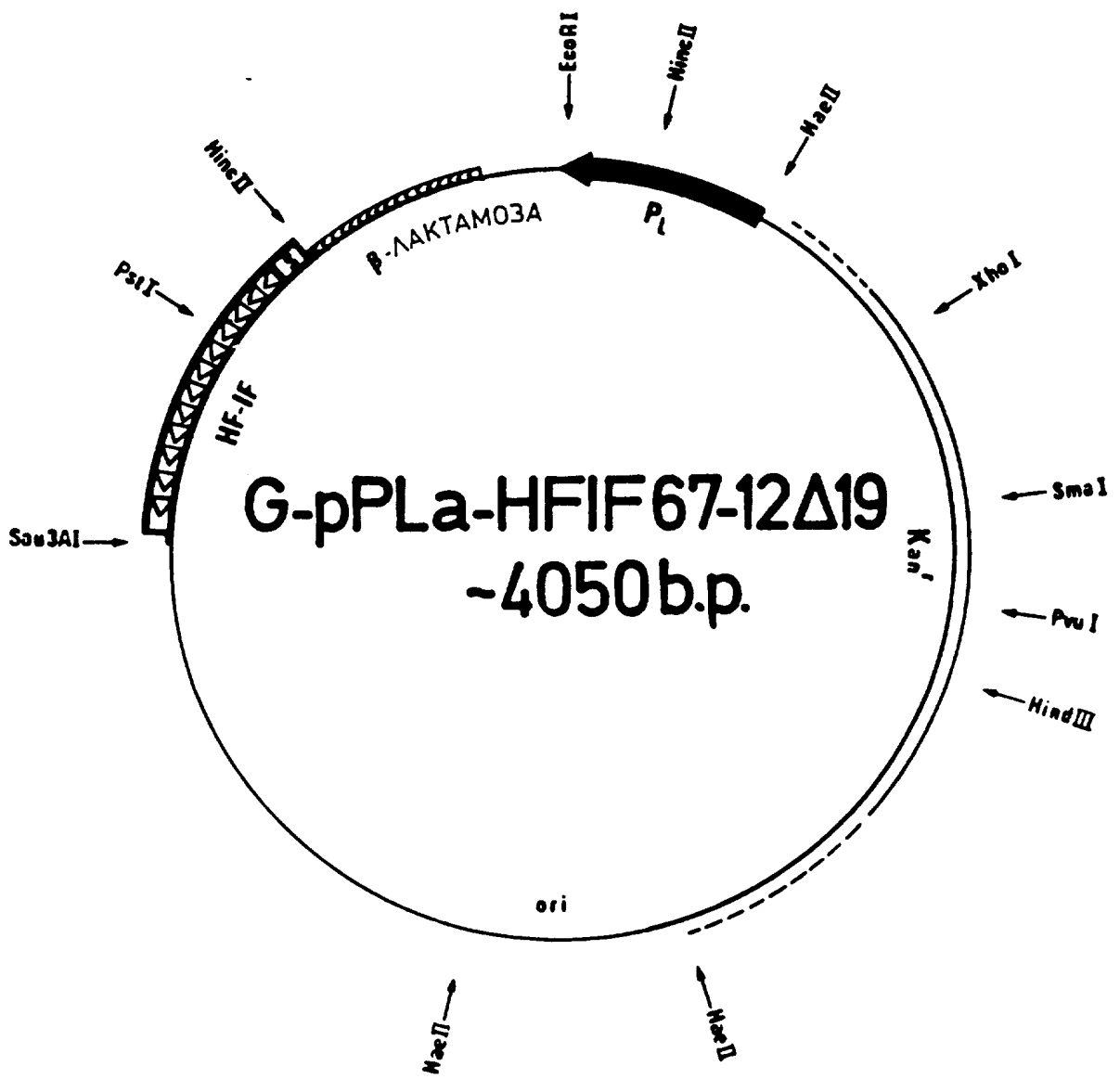


FIG.13

