



(19) KG (11) 152 (13) C2

ГОСУДАРСТВЕННОЕ АГЕНТСТВО  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ (КЫРГЫЗПАТЕНТ)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ к патенту Кыргызской Республики

---

---

(10) 1414319

(21) 3302642/SU

(22) 30.06.1981

(31) 164986; 184909; 205578; 256204

(32) 01.07.1980; 08.09.1980; 10.11.1980; 21.04.1981

(33) US

(46) 01.10.1996, Бюл. №2, 1997

(71)(73) Ф. Хорфманн Ля Рош унд Ко. АГ, СН, Генентех Инк., US

(72) Девид Фан Нормен Геддель, Сидней Пестка, US

(56) Shigekazu N. et al. Synthensin E. coli of a polypeptide with human leukocyte interferon activity. Nature, v. 284, March, 1980, p. 316-320.

### (54) Способ получения лейкоцитарных интерферонов человека

(57) Изобретение относится к технологии рекомбинантных ДНК, т.е. к способам, использующимся в рекомбинантной ДНК-технологии, и к продуктам, полученным этими способами. Штамм бактерий *Escherichia coli* трансформируют рекомбинантами из группы pLeIF A 25, pLeIF B trp 7, pLeIF C trp 35, pLeIF D trp 11, pLeIF FF trp 1, pLeIF I trp 1 и pLeIF j trp 1, далее культивируют трансформанты, выделяют и очищают лейкоцитарный интерферон.

Изобретение относится к области технологии рекомбинантных ДНК, т.е. к способам, использующимся в рекомбинантной ДНК-технологии, и к продуктам, полученным этими способами.

Пример. Используют два микроорганизма: *E. coli* x 1776 и *E. coli* K-12 штамм 294 (конец *A. thi*<sup>-</sup>, *hsr*<sup>-</sup>, *hsm*<sup>+</sup><sub>K</sub>).

мРНК лейкоцитарного интерферона человека (LeIF) получают из лейкоцитов человека, взятых у больных хронической миелогенной лейкемией. Таковыми являются линия клеток, обозначенная KG-1, полученных от пациентов с острой миелогенной лейкемией.

У KG-1 клеток индуцируют продукцию лейкоцитарного интерферона мРНК с помощью вирусов Сендей или Ньюкастла. Клетки собирают 5 ч спустя после индуцирования и РНК приготовляют по методике с применением гуанидинтиоцианатгуанидингидрохлорида. Для получения 12 S фракций поли (A) мРНК используют олигодеокситимидин d

Т-целлюлозную хроматографию и сахарозное градиентное ультрацентрифугирование.

5 мкг мРНК используют для получения двойной цепочки кДНК по цепочечной методике. Указанные кДНК фракционируют по размерам с помощью электрофореза на 6 %-ном полиакриламидном геле и 230 нг материала с размерами в интервале от 500 до 1500 в.п. выделяют электроэлюированием. 100 нг этой кДНК присоединяют к деоксицитидиновым остаткам (dc) и реденатурируют с 470 нг плазмид pH R322, которые были соединены с деоксигуанозиновыми (dG) остатками по (Pst I) сайту и используют для трансформации *E. coli* x 1776. Получают устойчивые к тетрациклину, чувствительные к ампициллину трансформанты. Синтезируют четыре набора дезоксиолигонуклеотидных зондов для каждой последовательности, содержащие три (T-IA, B, C, D) или один (T-13A, B, C, D) олигонуклеотид каждая.

мРНК получают из 12 S РНК, KG-I индуцированных вирусом Сендей либо целиком поли (A) мРНК из неиндуцированных лейкоцитов.  $^{32}\text{P}$ -меченные кДНК готовят известным способом. Немеченный продукт выделяют с помощью гель-фильтрации на колонке, заполненной 10 мл Сефадекс® С-50, обработанной 0.3 N NaOH в течение 30 мин при 70°C для разрушения РНК, нейтрализуют HCl и осуществляют гибридизацию.

Для идентификации клонов pL1-pL30 используют быстрый процесс изолирования плазмиды по Бирнбойму.

При этом получают 1 мкг плазмиды ДНК из каждого 500 индивидуальных трансформантов *E.coli* K-12 штамма 294. Каждый образец ДНК денатурируют и наносят на нитроцеллюлозные фильтры в трех экземплярах, следуя методике Кафатоса с сотр. (см. выше).

Три группы нитроцеллюлозных фильтров, содержащих 500 образцов плазмид, гибридизируют со стимулированной кДНК, заложенной с T-1 группой носителей информации (праймеров), T-13, заложенной стимулированной кДНК, нестимулированной кДНК, приготовленной с использованием обеих носителей информации.

Клоны считают положительными, если они гибридизируют сильнее один или оба зонда стимулированной кДНК, чем полностью нестимулированный зонд. Было отобрано 30 положительных клонов (pL1-pL30) из 500 для дальнейшего анализа.

Трансформанты *E.coli* x 1776 скринируют по методике гибридизации колоний, используя в качестве зонда  $^{32}\text{P}$ -меченую стимулированную мРНК. Немеченную мРНК из нестимулированных клеток смешивают с зондом при соотношении 200:1 для конкуренции с нестимулированной мРНК, имеющейся в  $^{32}\text{P}$ -меченом препарате. Гибридизация меченой мРНК будет происходить предпочтительно в колониях, содержащих стимулированные последовательности. Получают три класса трансформантов: 2-3 % колоний, гибридизованных  $^{32}\text{P}$ -мРНК очень сильно, 10 % гибридизованных значительно меньше, чем 1-й класс; остальное, не дающее определимый сигнал гибридизации.

Исследуют положительные колонии (классы 1 и 2) на наличие интерферон-специфических последовательностей с помощью анализа, который зависит от гибридизации интерфероновой мРНК конкретно в плазмиду ДНК. Первоначально выращивают индивидуально 60 сильно положительных колоний (класс 1) в 100 мл среды M9, дополненной тетрациклином (200 мкг/мл), диаминопи-мелиновой кислотой (100 мкг/мл), тимицином (20 мкг/мл), и d-биотином (1 мкг/мл).

Среда M9 содержит 6 г/л  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 3 г/л  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.5 г  $\text{NaCl}$  и 1 г/л  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . После автоклавирования прибавляют 1 мл стерильного 1M  $\text{MgSO}_4$  и 10 мл стерильного 0.01 M  $\text{CaCl}_2$ . Собирают 10 культур и изолируют плазмиду ДНК из шести пулов, как описано Клевеллом с сотр. Biochemistry 9, 4428-440 (1970). 10 мкг каждого пула плазмиды ДНК расщепляют Hind III, денатурируют и ковалентно связывают с ДБМ (диазобензилоксиметиловой) бумагой. На каждом фильтре гибридизуют 1 мкг очищенной мРНК из стимулированных клеток. Негибридизованную мРНК удаляют промывкой. Специфически гибридизованную мРНК элюируют и транслируют в социты личинок *Xenopus*. По этой пробе все 6 пулов были отрицательными. 5 пулов из 10 колоний каждый и 1 пул из 9 коло-

ний делают из 59 слабо положительных колоний (класс 2). Готовят плазмиды из пулов и исследуют, как описано выше. Среди 6 тестированных пулов был тестирован один (к 10), гибридизованный в интерферонную мРНК при условии значительно выше исходных уровней каждого времени. Для того чтобы определить специфический интерферонный кДНК-клон готовят плазмиды ДНК из 9 колоний пула К10 и исследуют индивидуально. Две из девяти плазмид (№101 и №104) связывают интерферонную мРНК существенно лучше, чем при указанных исходных уровнях. Из плазмиды №104 выделяют один *Bgl* II рестрикционный фрагмент, содержащий 260 в.р., меченный  $^{32}\text{P}$  с использованием процедуры, описанной Тейлором с сотр., и используют в качестве зонда для независимого скрининга 4000 *E. coli* 294 трансформантов с помощью процедуры скрининга колоний *in situ*.

Идентифицируют 9 колоний (pL 31-pL 39), которые гибридизуют до различной степени с этим зондом.

Кроме того, используют меченный 260 в.р. фрагмент для независимого скрининга 4000 *E. coli* 294 трансформантов таким же образом. Идентифицируют 50 колоний, которые гибридизуют до различной степени с этим зондом. Одна содержит LeIF C-фрагмент, одна - LeIF H-фрагмент и одна - фрагмент, обозначенный LeIF HI, очень похожий на LeIF H. Полученные гибридные плазмиды обозначают pLEIF H и т.п.

Готовят плазмиду ДНК из всех 39 потенциальных LeIF кДНК клонов и проводят повторный скрининг с тем же 260 в.р. ДНК зондом, используя процедуру гибридизации Кафатоса с сотр. (см. выше). Три плазмиды (pL 4, pL 31, pL 34) дают очень сильные признаки (сигналы) гибридизации, четыре (pL 13, pL 30, pL 32, pL 36) гибридизованы умеренно и три (pL 6, pL 8, pL 14) слабо гибридизованы зондом.

Также скренируют 39 потенциальных LeIF кДНК рекомбинантных плазмид с использованием  $^{32}\text{P}$ -меченых синтетических ундекамеров (индивидуальные T-1 первичные пулы праймеров информации или индивидуальные T-13 праймеры информации) непосредственно в качестве гибридизующих зондов. Условия гибридизации выбирают таким образом, что для определимых сигналов гибридизации должны требоваться точно спаренные основания. Следовательно, плазмида ДНК из 3 клонов была приготовлена по стандартной процедуре очищения лизата (Клевелл с сотр., см. выше) и очищена колонной хроматографией на Биорад Агарозе А-50.

Образцы по 3 мкг каждого препарата делают линейными обработкой Eco R1, денатурируют в щелочи и наносят на 2 отдельных нитроцеллюлозных фильтра по 1.5 мкг на пятно (Кафатос с сотр., см. выше). Фосфорилируют индивидуальные синтетические деоксиолигонуклеотидные праймеры информации и пулы праймеров информации с помощью ( $\gamma$   $^{32}\text{P}$ ) АТР следующим образом: 50 пкмоль олигонуклеотида и 100 пкмоль ( $\gamma$   $^{32}\text{P}$ ) АТР, (2500 Кю/ммоль) объединяют в 30 мкл 50 мМ трис-НCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 15 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанола. Добавляют 2 ед. T4 полинуклеотидкиназы и после 30 мин. при 37°C,  $^{32}\text{P}$ -меченные праймеры информации очищают хроматографией в колонках с 10 мл Сефадекс<sup>(p)</sup> G-50. Гибридизации осуществляют с использованием  $10^6$  срм пула праймеров T-13C или  $3 \cdot 10^6$  срм пула праймера T-1C при 15°C в течение 14 ч в 6x SSC (1xSSC = 0.15 M NaCl, 0.015 M лимоннокислого натрия, pH 7.2, 10 x раствор Денхардта (0.2 % бычьего сывороточного альбумина, 0.2 % поливинилпиролидона, 0.2 % фиколла). Фильтры промывают 5 мин (3 раза) при 0°C 6x SSC, сушат и облучают на рентгеновской пленке.

При этом плазмида ДНК из клона 104 дает значительную гибридизацию с пулом праймеров информации T-1C и праймеров информации T-13C, но не дает определимой гибридизации с другими ундекамерами. Несколько из 39 потенциальных LeIF плазмид (pL 2, 4, 13, 17, 20, 30, 31, 34) также гибридизуют с обоими этими зондами. Pst I-усвоение pL 31 показывает размер кДНК-вставки, который должен составлять примерно 1000 в.р.

Найдено, что первый ATC-транслирующий начальный кодон состоит из 60 нуклеотидов от 5' конца последовательности и затем 188 кодонов после TGA концевого триплета, имеется 342 нетранслируемых нуклеотидов у 3' конца, следующих на поли-(A)-последовательностью. Путативный сигнальный пептид (по-видимому, включенный в секрецию

готового LeIF из лейкоцитов) имеет длину из 23 аминокислот. 165 аминокислот, составляющих готовый LeIF, имеют рассчитанный молекулярный вес 19390, LeIF, закодированный pL 31 обозначают LeIF A. SAU 3A рестрикционный эндонуклеазный участок расположен между кодонами 1 и 3 ω FA. Два синтетических деоксиолигонуклеотида включают ATG-транслирующий начальный кодон, реконструируют кодон аминокислоты 1 (цистеин) и создают Eco RI липкий конец. Эти олигомеры были связаны в 34 в. р. SAU 3A-A aII фрагмент pL 31. Полученный в результате 45 в.р. продукт лигируют в два дополнительных фрагмента ДНК для конструирования 86.5 в.р. синтетического (натурального) гибридного гена, который кодирует LIF A и который связывается Eco RI и Pst I (рестрикционными участками). Такой ген включают в pB R322 между Eco RI и Pst I участками для получения плазиды PLIF AI.

Конструкция триптофанового контрольного элемента, содержащего *E.coli trp* промотор, оператор и *trp* лидер рибосомсвязывающего участка, но не содержащего ATC-последовательности для инициирования трансляции.

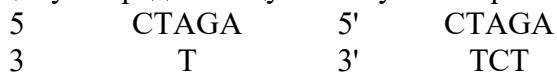
Плазмида pGMI несет триптофановый оперон *E. coli*, содержащий делецию ΔL E1413, и экспрессирует протеин, включающий первые 6 аминокислот *trp* лидера и приблизительно последний третий *trp* Е полипептид (позже упоминаемый в сочетании как LE), а также *trp* D полипептид в его целости, все под контролем системы *trp* промотор-оператор. Плазиду (20 мкг) обрабатывают рестрикционным ферментом PVU II, который расщепляет плазиду на пять участков. Генные фрагменты затем комбинируют с линкерами Eco RI, состоящими из самокомплементарного олигонуклеотида с последовательностью pCAT-GAATTCAATG, обеспечивая Eco R I-участок расщепления для последующего клонирования в плазиду, содержащую Eco RI-участок. Обрабатывают 20 мкг ДНК-фрагментов, полученных из pGMI, 10 ед. *T<sub>4</sub>* ДНК-лигазы в присутствии 200 пкмоль 5'-фосфорилированного синтетического олигонуклеотида pCATGAATTCAATG и в 20 мкл *T<sub>4</sub>* ДНК-лигазного буфера (20 мМ трис, pH 7.6, 0.5 мМ АТФ, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 мМ дитиотрейтоля) при 4°C в течение ночи. Затем раствор нагревают 10 мин при 70°C до прекращения лигации. Связки отщепляют перевариванием Eco RI и фрагменты, теперь с концами Eco RI, отделяют, используя электрофорез на 5 %-ном полиакриламидном геле (ПАГЭ), и при наиболее широких фрагментах, выделенных из геля первым пятном с этидиумбромидом, локализуя фрагменты ультрафиолетовым светом, и вырезают из геля интересующие участки. Помещают каждый гелевый фрагмент с 300 мкл 0.1 xTBE в диализаторный бачок и подвергают электрофорезу при 100 В в течение часа в 0.1xTBE-буфере (TBE-буфер содержит: 10.8 г трисоснования, 5.5 г борной кислоты, 0.09 г Na<sub>2</sub>-ЭДАТУК в 1 л воды). Водный раствор собирают из диализаторного бачка, экстрагируют фенолом, экстрагируют хлороформом, делают 0.2 М раствор хлористого натрия и извлекают ДНК в воде после осаждения этанолом, содержащий ген *trp* промотор-оператор с липкими концами Eco RI идентифицируют по указанной ниже процедуре, которая вызывает вставление фрагментов в чувствительную к тетрациклину плазиду, которая при вставлении промотор-оператора становится устойчивой к тетрациклину.

Плазмида pBRHI экспрессирует ампициллиновую устойчивость и содержит ген устойчивости к тетрациклину. Следовательно, плазмида чувствительна к тетрациклину. Плазиду делают устойчивой к тетрациклину путем введения системы промотор-оператор в участок EcoRI.

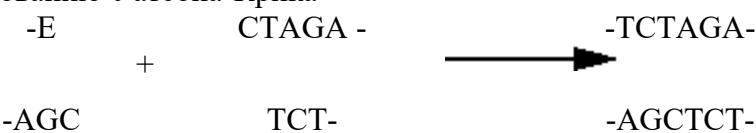
pBRHI расщепляют EcoRI и удаляют фермент экстракцией фенолом с последующей экстракцией хлороформом и собирают в воде после осаждения этанолом. Полученную в результате молекулу ДНК в отдельных реакционных смесях объединяют с каждым из трех фрагментов ДНК, полученных выше, и лигируют с *T<sub>4</sub>* ДНК-лигазой, как описано выше. Используют ДНК, находящуюся в реакционной смеси, для трансформации *E. coli* K-12 штамма 294 по стандартной методике и бактерии помещают на LB (Luria-Bertani)-пластины, содержащие 20 мкг/л ампициллина и 5 мкг/л тетрациклина. Отбирают несколько устойчивых к тетрациклину колоний, изолируют плазиду ДНК и доказывают

наличие желаемого фрагмента с помощью рестрикционного ферментного анализа. Полученную плазмиду обозначают pB RH trp.

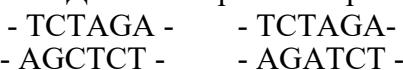
Продукт расщепления с помощью Eco RI и Bam HI вирусного генома гепатита В получают традиционным способом и клонируют в Eco RI и Bam HI участки плазмиды pG H 6 для образования плазмиды pH S 32. Затем расщепляют плазмиду pH S 32 с помощью Xba I, экстрагируют фенолом, хлороформом, осаждают этанолом и обрабатывают 1 мкл E. coli ДНК-полимеразой I Klenow фрагмент (Боерингер-Манхейм) в 30 мкл полимеразного буфера (50 мМ фосфата калия pH 7.4 мМ MgCl<sub>2</sub> 1 мМ β-меркаптоэтанола), содержащего 0.1 мМ d TTP и 0.1 мМ d CTP, в течение 30 мин при 0°C, затем 2 ч при 37°C. Такая обработка приводит к заполнению 2 из 4 нуклеотидов, комплементарных к выступающему вперед 5 концу Xba I участка расщепления,



Два нуклеотида, dC и dT, были включены и дали конец с двумя выступающими вперед 5' нуклеотидами. Такой линейный остаток плазмиды pH S 32 (после экстракции фенолом и хлороформом и сбора в воде после осаждения этанолом) расщепляют Eco RI, отделяют широкий плазмидный фрагмент от меньшего Eco R I-XbaI-фрагмента с помощью ПАГЭ и изолируют после электроэлюирования. Этот ДНК-фрагмент из pH S 32 (0.2 мкл) связывают в условиях, подобных указанным выше, с Eco R I-Tag I-фрагментом триптофанового оперона (~0.01 мкг), происходящего из pB RH trp. В способе легирования фрагмента из pH S 32 к фрагменту Eco R I - Tag I, как описано выше, выступающий вперед Tag I конец связан с выступающим вперед концом Xba I, хотя он не совершенно спарен основанию Уатсона-Крика



Часть этой лигационной реакционной смеси трансформируют в клетки E. coli 294, проводят термообработку и помещают на пластины LB, содержащие ампциллин. Отбирают 24 колонии, выращивают в 3 мл LB (Лурия-Бертани) среды и изолируют плазмиду. Найдено, что 6 из них имеют XbaI-участок регенерированный с помощью E. coli, катализированной ДНК повторным спариванием и репликацией



Найдено, что эти плазмиды расщепляются как Eco R I, так и Hpa I и дают ожидаемые рестрикционные фрагменты. Одну плазмиду, обозначенную pTrp 14, используют для экспрессии гетерологических полипептидов.

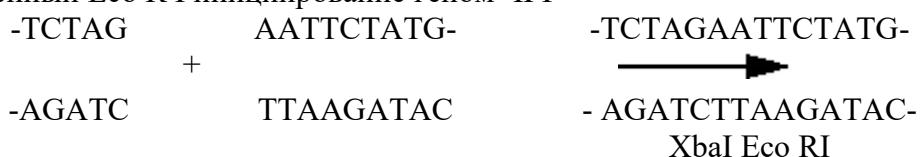
Плазмида pHGH 107 содержит ген человеческого гормона роста (ЧГР), составленный из 23 аминокислотных кодонов, полученных из синтетических ДНК-фрагментов, и 163 аминокислотных кодонов, полученных из комплементарной ДНК, полученной с помощью обратной транскрипции информационной РНК ЧГР. Этот ген, хотя в нем отсутствуют кодоны ргс последовательности ЧГР, содержит ATG-транслирующий начальный кодон. Этот ген изолируют из 10 мкг pHGH 107 после обработки Eco R I с последующей обработкой E. coli ДНК полимеразой Кленоза фрагмента и d TTP и d ATP, как указано выше. После экстракции фенолом и хлороформом и осаждения этанолом плазмиду обрабатывают Bam HI.

Фрагмент, содержащий ген ЧГР, изолируют с помощью ПАГЭ с последующим электроэлюированием. Полученный в результате ДНК-фрагмент также содержит первые 350 нуклеотидов устойчивого к тетрациклину структурального гена, но в нем отсутствует тетрациклическая система промотор-оператор, так что при последовательном клонировании в экспрессионную плазмиду плазмиды, содержащие вставку, могут быть обнаружены по восстановлению устойчивости к тетрациклину. Так как Eco RI конец фрагмента был заполнен в процедуре полимеразой I Кленова, фрагмент имеет один тупой и один липкий

конец, обеспечивающий четкую ориентацию при последующем включении в экспрессивную плазмиду.

Затем готовят экспрессивную плазмиду pTrp 14 для получения фрагмента, содержащего ЧГР-ген, приготовленного ранее. pTrp 14 расщепляют XbaI и полученные липкие концы заполняют по процедуре полимеразой I Кленова, применяя d ATP, d TTP, dG TP и d CTP. После экстракции фенолом и хлороформом и осаждения этанолом полученную в результате ДНК обрабатывают Bam H I и изолируют полученный в результате широкий плазмидный фрагмент с помощью ПАГЭ и электроэлюирования. Фрагмент, происходящий из pTrp 14, имеет один тупой и один липкий конец, позволяющий рекомбинацию с четкой ориентацией с фрагментом, содержащим ЧГР-ген, описанный ранее.

Фрагмент гена ЧГР и фрагмент pTrp 14 Δ Xba-Bam H I объединяют и лигируют в условиях, подобных описанным выше. Заполненные XbaI и Eco R I концы, связанные вместе связкой по тупому концу для воссоздания участков XbaI и Eco R I; заполненный XbaI заполненный Eco R I инициирование геном ЧГР



Такая конструкция также воссоздает ген устойчивости к тетрациклину. Так как плазмида pHGH 107 экспрессирует устойчивость к тетрациклину из промотора, расположенного выше гена ЧГР (lac-промотор), эту конструкцию обозначают pHGH 207, она позволяет осуществить экспрессию гена устойчивости к тетрациклину под контролем триптофанового промотора-оператора. Лигационную смесь трансформируют в E. coli 294 и отбирают колонии на LB-пластинах, содержащих 5 мкг/л тетрациклина.

Плазмиду pH CH 207 расщепляют Eco R I с помощью ПАГЭ и электроэлюирования и выделяют фрагмент, содержащий trp промотор, оператор и trp ведущий рибосомный связующий участок, но в котором отсутствует ATG-последовательность для инициирования трансляции. Этот фрагмент ДНК клонируют и Eco R I участок pLeIF A. Экспрессионные плазмиды, содержащие модифицированный выше trp регулятор (E. coli trp оперон, из которого была изъята истощенная последовательность для контролируемого повышения уровней экспрессии), выращивают до заранее определенных уровней в питательной среде, содержащей добавку триптофана в количестве, достаточном для подавления (репрессии) системы промотор-оператор, затем изымают триптофан, чтобы дерепрессировать систему и вызвать экспрессию целевого продукта. Для этого 250 мкг плазмиды pL 31 расщепляют pst I и изолируют 1000 в. р. вставку гель-электрофорезом на 6 %-ном полиакриламидном геле.

Из геля элюируют примерно 40 мкг вставки и разделяют на три аликовта для дальнейшего расщепления образца 16 мкг этого фрагмента частично расщепляют 40 ед. Bgl II в течение 45 мин при 37°C и очищают реакционную смесь на 6 %-ном полиакриламидном геле. Собирают приблизительно 2 мкг целевого 670 в.р. фрагмента.

Другой образец (8 мкг) из 1000 в.р. pst I вставки рестриктируют A v all и Bgl II. Собирают 1 мкг указанного 150 в. р. фрагмента после гель-электрофореза.

Обрабатывают 16 мкг 1000 в.р. часть SAU 3a и A v all. После электрофореза на 10 %-ном полиакриламидном геле собирают приблизительно 0.25 мкг (10 пкмоль) 34 в. р. фрагмента.

Синтезируют два указанных дезоксиолигонуклеотида 5'-d AATTCAATGTGT (фрагмент 1) и 5' - d-GATCACACATG (фрагмент 2) по фосфоротриэфирной процедуре.

Фрагмент 2 фосфорилируют следующим образом.

Высушивают 200 мкл (~40 пкмоль) ( $\gamma$  <sup>32</sup>P) - ATP (Qmersham 500 кю/ммоль) и повторно сусpendingируют в 30 мкл 60 mM три-НСl (pH 8), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 15 mM  $\beta$ -меркаптоэтанола, содержащего 100 пкмоль ДНК фрагмента и 2 ед. T4 полинуклеотидной киназы. После 15 мин при 37°C прибавляют 1 мкл 10 mM ATP и реакция продолжается еще 15

мин. Затем смесь нагревают при 70°C в течение 15 мин, объединяют с 100 пкмоль 5'-ОН фрагмента 1 и 10 пкмоль 34 в. р. SAU 3a-A в all фрагмента. Связывание осуществляют в течение 5 ч при 4°C в 50 мкл 20 мМ трис-HCl (рН 7.5), 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ дитиотрейтоля, 0.5 мМ ATP и 10 ед. T4 ДНК лигазы. Смесь подвергают электрофорезу на 6 %-ном полиакриламидном геле и электроэлюированием собирают 45 в. р. продукт. Объединяют 30 нг (1 пкмоль) 45 в. р. продукта с 0.5 мкг (5 пкмоль) 150 в.р. A в all-Bgl 2-го фрагмента и 1 мкг (2 пкмоль) 670 в.р. Bgl II-Pst 1-го фрагмента. Лигирование осуществляют при 20°C в течение 16 ч, используя 20 ед. T4 ДНК лигазы. Лигазу инактивируют, нагревая при 65°C в течение 10 мин. Затем смесь усваивают Eco R I и Pst I для удаления полимеров из гена. Смесь очищают на 6 %-ном ПАГЭ. Изолируют около 20 нг (0.04 пкмоль) 865 в. р. продукта. Половину этого продукта (10 нг) лигируют в pBR 322 (0.3 мкг) между сайтами Eco R I и Pst I. Трансформация *E. coli* 294 дала 70 устойчивых к тетрациклину, чувствительных к ампициллину трансформантов. Плазмиду ДНК, изолированную из 18 из этих трансформантов, расщепляют Eco R I и Pst I. 16 из 18 плазмид имеют Eco R I-Pst 1 фрагмент 865 в. р. в длину. Расщепляют 1 мкг одной из них, pLeIF A I, Eco R I и лигируют в 300 в.р. Eco RI фрагмент (0.1 мкг), содержащий *E. coli* trp промотор и ведущий рибосомный связывающий сайт, приготовленный как описано выше. Идентифицируют трансформанты, содержащие trp промотор, используя <sup>32</sup>P-trp зонд в сочетании с процедурой скрининга колоний Грюнштейна-Хогнесса. Асимметрично расположенный Xba I сайт в trp фрагменте позволяет определить рекомбинанты, в которых trp-промотор ориентирован в направлении LeIF A-гена.

#### Определение активности LeIF A.

Экстракты готовят для IF анализа следующим образом.

1 мл культуры выращивают в α-бульоне, содержащем 5 мг/мл тетрациклина до значения A<sub>550</sub> около 1.0. Затем разбавляют 25 мл среды M9, содержащей 5 мкг/мл тетрациклина. 10 мл образцы собирают центрифугированием, когда A<sub>550</sub> достигнет значения 1.0 и гранулированные клетки сусpendируют в 1 мл 15 % раствора сахарозы, 50 мМ трис-HCl (рН 8.0), 50 мМ ЕДТА. Добавляют 1 мг лизозима и через 5 мин инкубации при 0°C клетки разрушают воздействием ультразвука. Образцы центрифугируют в течение 10 мин (15000 об/мин) и активность интерферона в верхнем слое определяют сравнением со стандартами LeIF с помощью цитопатического эффекта (CPE) ингибирования. Для определения числа IF молекул на клетку используют LeIF удельную активность порядка 4 • 10<sup>8</sup> ед/мг.

Клон pLeIF A trp 25, в котором trp промотор вставляют в желаемой ориентации, дает высокие уровни активности (до 2.5 • 10<sup>8</sup> ед/л). Полученный с помощью *E.coli* K-12 штамма 294/pLeIF A trp 25 ведет себя подобно аутентичному человеческому LeIF, он устойчив к обработке при pH 2 и нейтрализуется античеловеческими лейкоцитарными антителами кроликов. Такой интерферон имеет кажущийся молекулярный вес приблизительно 20000.

Выделение с ДНК дополнительных лейкоцитарных интерферонов, ДНК из LeIF с ДНК-содержащей плазмиды вырезают с помощью pst 1, выделенной электрофорезом, и метят изотопом <sup>32</sup>P. Полученную в результате радиоактивно меченую ДНК используют в качестве зонда для скрининга дополнительных *E. coli* 294 трансформантов, полученных по способу, идентичному описанному в части С по методике *in situ* скрининга колонии, предложенной Грунштейном и Хогнессом (см. выше). Колонии, которые в различных количествах гибридизировали с зондом, выделяют Плазмиду ДНК из таких колоний и десять гибридизированных колоний, на которые ссылаются выше, с помощью Pst I и характеризуют тремя различными способами. Во-первых, образцы рестракционного эндонуклеазного расщепления с энзимами Bgl II, PVU II и Eco R I. Такой анализ позволяет классифицировать по крайней мере восемь различных типов (LeIF A, LeIF B, LeIF C, LeIF D, LeIF E, LeIF F, LeIF G, LeIF H), что соответствует приблизительно положению различных рестрикционных разрезов относительно известной в настоящее время предварительной последовательности и кодирующей последовательности.

Во-вторых, некоторые из ДНК испытывают на гибридизационный выбор для установления способности селективно удалять LeIF и RHK из поли-А, содержащей KG-1 клеточной РНК. Согласно этому анализу LeIF A, B, C и F дают положительные результаты. В-третьих, последние фрагменты внедряют в экспрессионную плазмиду E.coli 294, трансформируют с плазмидой и фрагменты экспрессируют. Продукты такого экспрессирования представляют собой преинтерфероны, дают положительные результаты при СРЕ анализе на активность интерферона, хотя и обладают маргинальной активностью в случае LeIF F-фрагмента.

В последовательности изолированного фрагмента, содержащего ген зрелого LeIF B, первые четырнадцать нуклеотидов типов A и B были идентичны. В соответствии с этим фрагмент из pLeIF A 25, несущий trp промотор-оператор, место присоединения рибосомы и начало LeIF A(=B) гена, выделяют и соединяют с остающейся частью B последовательности в экспрессионной плазмиде.

Для получения приблизительно 950 в.р. SAU 3a к Pst фрагменту необходимо несколько стадий ввиду наличия одного или более чередующихся SAU 3a рестракционных сайтов.

1. Выделены следующие фрагменты:

- а) 110 в. р. от SAU 3a до Eco R I,
- в) λ, 132 в. р. от Eco R I до Xba,
- с) > 700 в. р. от Xba до Pst.

2. фрагменты (1а и 1б) лигируют и разрезают с помощью Xba и Bgl II с тем, чтобы предотвратить самополимеризацию через SAU 3a и Xba концевые терминалы (соответствующий SAU 3a сайт находится внутри сайта Bgl II, Bgl II разрезают с тем, чтобы оставить SAU 3a - липкий конец). Выделяют 242 в.р. фрагмента.

3. Продукт со стадий (2) и (1 с) лигируют и разрезают с помощью Pst I и Bgl II для того, чтобы предотвратить самополимеризацию. Выделяют приблизительно 950 в.р. фрагмента от SAU 3a до Pst. Такой фрагмент содержит часть LeIF B гена, не характерную для LeIF A.

4. Приблизительно 300 в.р. фрагмента от Hind III до SAU 3a, содержащего trp промотор-оператор, сайт присоединения рибосомы, ATG начальный сигнал и цистеиновый кодон LeIF A, выделяют из pLeIF A 25.

5. Приблизительно 3600 в.р. фрагмента Pst I - Hind III выделяют из pB R 322. Такой фрагмент содержит репликон и кодированный тетрациклин, но не обладает устойчивостью к ампициллину.

6. Фрагменты, полученные на стадиях 3, 4, 5, лигируют и полученную в результате плазмиду трансформируют в E.coli K-12 штамм 294.

Трансформанты подвергают минискринингу и образцы плазмиды расщепляют с помощью Eco R I. Продукты такой реакции представляют три фрагмента со следующими характеристиками: Eco R I - Eco R I trp промоторный, мент, внутренний Eco R I - Eco R I - Eco R I фрагмент pL4 и протеинтрансляционный начальный сигнал - Eco R I фрагмент pL4.

Согласно СРЕ анализу бактериальные экстракты из клонов, полученных указанным способом, обычно имеют примерно  $10 \cdot 10^6$  ед. интерфероновой активности на литр при  $A_{550} = 1$ . Один из таких клонов, полученных указанным способом, представляет собой E. coli 294/pLeIF B trp 7.

Прямое экспрессирование дополнительных зрелых лейкоцитарных интерферонов (LeIF C, D, F, H, I и L).

Дополнительные генные фрагменты полной длины, которые содержат другие LeIF типы, могут быть преобразованы в последовательность и помещены в экспрессионные "векторы" для экспрессирования, как это имеет место в случае LeIF A.

Короткая длина синтетической ДНК, обрывающаяся на 3'-конце кодирующей спирали, с трансляционным начальным сигналом ATG затем лигируют, например, путем

лигирования тупого конца к полученному в результате сплиту гену для зрелых интерферонов, ген внедряют в экспрессионную плазмиду и регулируют с помощью промотора и связанного с ним сайта присоединения рибосомы.

Согласно способу, аналогичному описанному выше, генные фрагменты, кодирующие LeIF C и LeIF D, соответствующим образом конфигурируют для прямого бактериального экспрессирования. Экспрессионная стратегия для таких дополнительных лейкоцит-ных интерферонов в каждом случае включает использование приблизительно 300 в. р. фрагмента (Hind III SAU 3a) содержащего trp промотор-оператор, сайт присоединения рибосомы, ATG-начальный сигнал и цистeinовый кодон LeIF A из pLeIF A 25. К нему присоединяют генные фрагменты из дополнительных интерфероновых генов, кодирующих их соответствующие последовательности аминокислот выше исходного цистеина, присущего всем последовательностям. Каждую полученную в результате плазмиду используют для трансформации *E. coli* K-12 штамм 294.

Из pLeIF C выделяют следующие фрагменты:

- а) 35 в. р. SAU 3A SAU 96,
- в) > 900 в.р. SAU 96 - Pst I,

с) выделяют приблизительно 300 в. р. фрагмента (Hind III - SAU 3a) из pLeIF A 25 аналогично описанному в части 4,

д) выделяют приблизительно 3600 в. р. фрагмента согласно части 5.

Построение.

1. Лигируют (а) и (с). Расщепление проводят с помощью Bgl II, Hind III и выделяют приблизительно 335 в. р. продукта.

2. Проводят тройное лигирование (1)+(b)+(d) и трансформацию *E. coli* с помощью полученной в результате плазмиды.

Соответствующий клон, полученный таким образом, представляет собой *E. coli* K-12 штамм 294/pleIF C trp 35. LeIF D.

Из pLeIF D выделяют: а) 35 в. р. SAU 3A - A v all, в) 150 в. р. A v all Bgl II, с) приблизительно 700 в. р. Bgl II - Pst I.

Из pLeIF A 25 выделяют: д) 300 в. р. Hind III - SAU 3a.

Из pB R 322 выделяют: е) приблизительно 3600 в. р. Hind III - Pst I.

Построение.

1. Лигируют (а)+(b), разрезают с помощью Bgl II и очищают 185 в. р. Продукта (1).

2. Лигируют (1)+(d) разрезают с помощью Hind III, Bgl II и очищают приблизительно 500 в. р. продукта (2).

3. Лигируют (2)+(c)+(e) и трансформируют *E. coli* с помощью полученной в результате плазмиды.

Соответствующий клон, полученный таким способом, представляет собой *E. coli* K-штамма 294/pleIF D trp 11. Le IF F содержащий фрагмент может быть сплит для прямого экспрессирования через пересборку, упрощенную полной гомологией аминокислот 1-13 LeIF B и LeIF F trp промотор-содержащий фрагмент (а) с соответствующим образом конфигурированными концами получают из ЧГР 207 согласно описанному выше, через Pst I и Xba I-расщепление с последующим выделением приблизительно 1050 в. р. фрагмента. Второй фрагмент (б) получают в виде более крупного из фрагментов, полученных Pst I и Bgl II расщеплением плазмиды pHK Y 10.

Фрагмент (а) содержит приблизительно половину гена, кодирующую устойчивость к ампициллину, фрагмент (б) - остаток гена и полный ген, кодирующий устойчивость к тетрациклину. Фрагменты (а) и (б) объединяют через T4 лигазу и продукт обрабатывают Xba I и Bg II для подавления димеризации с образованием фрагмента (с), содержащего trp промотор-оператор и гены устойчивости к тетрациклину и ампициллину.

Фрагмент (д), содержащий приблизительно 580 в. р., получают расщеплением pLeIF F под воздействием A Ya II и Bgl II. Он содержит кодоны аминокислот 14-166 LeIF F.

Фрагмент (e) (49 в. р.) получают расщеплением pLeIF В под воздействием Xba I и A v all. Фрагмент (e) кодирует аминокислоты 1-13 LeIF F.

Фрагменты (c), (d) и (e) подвергают тройному лигированию в присутствии LT4-лигазы. Когезионные концы соответствующих фрагментов такие, что композиционная плазмида находится в состоянии правильной циркуляции и при этом ген устойчивости к тетрациклину находится под контролем trp промотора-оператора совместно с геном зрелого LeIF F, так что бактерии, трансформированные с помощью желаемой плазмиды, могут выбираться из пластиин, содержащих тетрациклин. Клон, полученный таким образом, представляет собой *E. coli* K-12 штамм 294/pLeIF F trp 1.

Полный LeIF H-ген может быть конфигурирован для экспрессирования в виде зрелого лейкоцитарного интерферона согласно следующему.

1. Плазмиду pLeIF H подвергают гидролизу в присутствии Hae II и RS aI с выделением 816 в. р. фрагмента, простирающегося от сигнального пептида аминокислоты 10 до 3' некодирующего участка.

2. Фрагмент денатурируют и подвергают синтезу с фрагментом Кленова ДНК полимеразы 1 с использованием синтетического дезоксирибо-олигонуклеотидного праймера 5'-ATGTGTAATCTGTCT.

3. Полученный в результате продукт расщепляют с помощью SAU 3a и выделяют 452 в. р. фрагмента, представляющего собой аминокислоты 1-150.

4. В результате расщепления LeIF H с помощью SAU 3a и Pst 1 и выделения полученного в результате 500 в. р. фрагмента получают ген, кодирующий аминокислоты от 150 до конца кодирующей последовательности.

5. Фрагменты, выделенные на стадиях (3) и (4), лигируют с образованием фрагмента

1	166
met cys	asp stop
ATG TGT.. + ..	GATTGA - ... - Pst I
SAU 3a	

кодирующего 166 аминокислоты LeIF-H.

6. pLeIF A trp 25 расщепляют с помощью Xba I, лигируют тупые концы с помощью ДНК полимеразы 1 и продукт реакции расщепляют с помощью Pst I. Полученный в результате большой фрагмент может быть выделен и лигирован с продуктом со стадии (5) с образованием экспрессионной плазмиды, способной после трансформации *E. coli* K-12 штамма 294 или другого бактериального хозяина экспрессировать зрелый LeIF H.

$\lambda$ -фазную Чарон 4A рекомбинантную библиотеку человеческого генома подвергают скринингу на лейкоцитарные интерфероновые гены. Радиоактивный LeIF-зонд, полученный из сДНК клона LeIF A, используют для скрининга 500000 колоний. Шесть LeIF геномных клонов получают в результате такого скрининга. В результате последующего скрининга и очистки колоний один из таких клонов,  $\lambda$  H LeIF 2, выбирают для дальнейшего анализа.

С использованием указанного способа могут применяться и другие зонды с тем, чтобы успешно провести выделение дополнительных LeIF клонов из человеческого генома. Они, в свою очередь, могут использоваться для получения дополнительных лейкоцитарных интерфероновых протеинов согласно изобретению.

1. 2000 в. р. Eco R I фрагмент клона  $\lambda$ , H LeIF 2 клонируют в pBR325 на сайте нахождения Eco R I. Полученную в результате плазмиду LeIF I расщепляют с помощью Eco R I и выделяют 2000 в. р. фрагмента. Деоксиолигонуклеотидный d AATTCTGCAG (конвертор Eco R I - Pst I) лигируют до 2000 в. р. Eco R I фрагмента и полученный в результате продукт расщепляют с помощью Pst I с образованием 2000 в. р. фрагмента, содержащего Pst I-концы. Этот продукт расщепляют с помощью SAU 96 и 1100 в. р. фрагмент выделяют.

2. Плазмиду pLeIF C trp 35 расщепляют с помощью Pst I и Xba I. Выделяют круп-

ный фрагмент.

3. Небольшой Xb aI - Pst I фрагмент из pLeIF C trp 35 расщепляют с помощью Xb aI и SAU 96. Выделяют 40 в. р. Xb aI - SAU 96 фрагмента.

4. Фрагменты, выделенные на стадиях (1), (2) и (3), лигируют с образованием экспрессионной плазмида pLeIF I trp 1. LeIF J.

1. Плазмида pLeIF J содержит 3.8 Hind III фрагмента человеческой геномной ДНК, которая включает LeIF J генную последовательность, и выделяют 700 в. р. Dde I - RSa I фрагмент.

2. Плазмиду pLeIF B trp 7 расщепляют с помощью Hind III и Dde I и выделяют 350 в. р. Hind III-Dde I фрагмент.

3. Плазмиду pB R 322 расщепляют с помощью Pst I, затупляют концы в результате инкубирования в присутствии ДНК полимеразы I (клевеновский фрагмент), затем расщепляют с помощью Hind III и выделяют крупный (-3600 в. р.) фрагмент.

4. Фрагменты, выделенные на стадиях (1) (2) и (3), лигируют с образованием экспрессионной плазмида pLeIF J trp I.

Очистка интерферона.

1. Замороженные клеточные гранулы, содержащие экспрессированный лейкоцитарный интерферон, разделяют вручную или с использованием соответствующего оборудования для уменьшения размера частиц. Частично оттаявшие клетки суспендируют в 4 об. буфера A, содержащего 0.1 М трил (рН 7.5 - 8.0), 10 % (вес/об) сахарозы, 0.2 М NaCl, 5 мМ ЕДТА, 0.1 мМ PMSF и 10-100 мМ MgCl<sub>2</sub>. Такую суспензию выдерживают при температуре приблизительно 4°C.

Полученную суспензию пропускают через гомогенизатор, работающий под давлением 6000 фунт/дюйм<sub>2</sub>, после чего снова пропускают через указанное устройство, но при давлении 1000 фунт/дюйм<sub>2</sub>. Эффлюент из гомогенизатора от двух проходов охлаждают в бане со льдом.

2. Медленно добавляют полиэтиленимин к гомогенной среде до концентрации около 0.35 % и полученной системе дают выстаиваться в течение 30 мин. Твердые вещества удаляют центрифугированием или фильтрацией. Температуру на этой стадии контролируют или проводят ее достаточно быстро, в результате чего верхний слой (фильтрат) поддерживается при температуре менее 10°C. Верхний слой (фильтрат) концентрируют ультрафильтрацией приблизительно до 1/10 начального объема. Мелкие частицы или туманность вдержанной фазе можно удалить на соответствующем фильтре, например на микропористой мембране.

3. Осветленный раствор загружают непосредственно в колонку с моноклональным антителом со скоростью подачи 5-8 см/ч (например, 25-40 мл/ч в колонку с диаметром 2.6 см). После загрузки колонку промывают приблизительно 10 об 25 мМ трил-НСl рН 7.5-8.5, включающего NaCl (0.5 М) и такое поверхностно-активное вещество, как Тритон-Х-100 (0.2 %) или его эквивалент. После промывки колонку споласкивают приблизительно 10 об. раствора, содержащего-0.15 М NaCl и поверхностно-активное вещество, такое как Тритон X-100 (0.1 %) или его эквивалент. Колонку элюируют 0.2 М раствором уксусной кислоты, содержащим такое поверхностно-активное вещество, как Тритон-Х-100 (0.1%) или его эквивалент. Фракцию, дающую протеиновый пик из колонки с моноклональным антителом (согласно УФ-спектроскопическому или другому анализу), объединяют и pH системы устанавливают равным приблизительно 4.5 с помощью 0.1 N раствора NaOH или 1.0 M трил-основаниями.

4. Объединенный интерфероновый пик загружают на катионообменник, такой как Ватман СМ 52 целлюлоза или его эквивалент, который уравновешивают подходящим буфером, таким как ацетат аммония, pH 4.5 (50 мМ). После загрузки колонку промывают уравновешивающим буфером до того момента, пока УФ-спектр дает ровный прямой при анализе элюента, в результате чего небольшое количество эффилюента элюируется с колонки. Затем колонку элюируют 25 мМ ацетата аммония и 0.12 М хлористого натрия или

их комбинацией, которая оптимизирует регенерацию интерферона и приводит к образованию лиофилизированного осадка на фильтре.

### **Формула изобретения**

Способ получения лейкоцитарных интерферонов человека с частичной последовательностью Cys-Ala-trp-Glu-Val-Val-Arg-Ala-Glu-Ile-Met-Arg-Ser-, предусматривающей трансформацию бактерий *E.coli* штамм 294 ATCC 31446 плазмидами, выбранными из группы pLeIF A 25, pLeIF B trp 7, pLeIF C trp 35, pLeIF D trp 11, pLeIF F trp 1, pLeIF I trp 1, pLeIF J trp 1, культивирование полученных трансформантов с последующим экстрагированием и очисткой полученных полипептидов.

Приоритет по признакам: 01.07.1980 при частичной последовательности Cys-Ala-trp-Glu-Val-Val-Arg-Ala-Glu-Ile-Met-Arg-Ser-, pLeIF A 25, pLeIF B trp 7, *Escherichia coli* ATCC 31446:

08.09.1980. при pLeIF C trp 35, pLeIF D trp H, pLeIF F trpI.

10.11.1980 при pLeIF I trp I, pLeIF J trp 1.

21.04.1981 при экстрагировании и очистке полученных полипептидов.

Ответственный за выпуск

Ногай С.А.

---

Кыргызпатент, 720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41, факс: (312) 68 17 03