



NORGE

(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **301481**

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 07 K 14/54, C 12 N 15/24

Patentstyret

(21) Søknadsnr	903544	(86) Int. inng. dag og	
(22) Inng. dag	13.08.90	søknadsnummer	
(24) Løpedag	13.08.90	(85) Videreføringsdag	
(41) Alm. tilgj.	15.02.91	(30) Prioritet	14.08.89, EP, 89202082
(45) Meddelt dato	03.11.97		14.09.89, EP, 89202331

(73) Patenthaver	Gist-Brocades BV, Postbus 1, NL-2600 MA Delft, NL
(72) Oppfinner	Lambertus Christiaan Johannes Dorssers, Randwijk, NL
	Robert Willem van Leen, Nieuwerkerk A/D IJssel, NL
(74) Fullmektig	Dag Dawes, Bryn & Aarflot AS, 0104 OSLO

(54) **Benevnelse** DNA-fragmenter som koder for analoger av human IL-3, ekspresjonsvektor inneholdende DNA'et, vertselle transformert med ekspresjonsvektoren og fremgangsmåte for fremstilling av et polypeptid analogt med IL-3

(56) **Anførte publikasjoner** EP 282185, WO 8805469, CA 110:37543

(57) **Sammendrag**

Mutanter av hIL-3 er beskrevet som har mangler som dekker mer eller mindre den fullstendige kodende region til hIL-3, mens deres biologiske aktivitet er beholdt. Foretrukne mutanter er de som har én eller flere mangler ved den N-terminale (aminosyrer 1-14) og/eller den C-terminale (aminosyrer 116-133, 120-130 og/eller 130-133) ende. En annen foretrukket gruppe av mutanter er erstatningsmutanter. Noen av disse mutanter har en antagonistisk effekt. Spesifikke eksempler er Cys -> Ala mutanter (Cys¹⁶ -> Ala¹⁶, Cys¹⁶Cys⁸⁴ -> Ala¹⁶Ala⁸⁴). Andre mutanter som har en antagonistisk effekt er Glu⁵⁰ -> Lys⁵⁰ og Lys⁷⁹ -> Glu⁷⁹. Endelig blir antistoffer beskrevet som er rettet mot spesifikke epitoper lokalisert mellom aminosyrene 29 og 54.

Den foreliggende oppfinnelse omhandler fremstilling av terapeutisk aktive polypeptider analoge med IL-3 som er oppnådd ved genteknologi. Spesifikt, omhandler oppfinnelsen DNA-fragmenter som koder for analoger av det humane interleukin-3 (IL-3). Mer spesifikt, inneholder nevnte analoger eller mutanter én eller flere delesjoner og/eller én eller flere substitusjoner. Den farmakologiske anvendbarhet av disse mutanter avhenger av deres spesifikke reseptorbinding og signaloverførende egenskaper.

Oppfinnelsens bakgrunn

Historisk, ble faktorer som affiserte hematopoetiske celler oppdaget i en metode som målte delingen og/eller differensieringen av benmargceller i bløtagarkulturer. Faktorene som viste denne aktivitet har under ett blitt betegnet som koloni-stimulerende faktorer (CSFer). Nylig er det blitt funnet at en rekke CSFer eksisterer, som delvis kan klassifiseres ved de hematopoetiske undergrupper som blir stimulert.

I humane og gnagersystemer, inkluderer disse proteiner G-CSF og M-CSF. Disse proteinene stimulerer in vitro-dannelsen av hhv. i det vesentligste nøytrofilgranulocyt og makrofagkolonier. Interleukin-2 ("IL-2") stimulerer delingen av både aktiverte T-celler og aktiverte B-celler, men antas ikke å være en koloni-stimulerende faktor.

GM-CSF og interleukin-3 ("IL-3", også kjent som "multi-CSF") stimulerer dannelsen av både makrofag og nøytrofile og eosinofile granulocyttkolonier. I tillegg, stimulerer IL-3 dannelsen av mast-, megakaryocyt- og rene og blandede erytroide kolonier (D. Metcalf, "The hematopoietic colony-stimulating factors", 1984, Elsevier, Amsterdam, og D. Metcalf, Science 299 (1985) 16-22).

Vekstfaktorindusert celledeling er en komplisert prosess. Etter en utpreget spesifikk binding av vekstfaktoren til dens reseptor på celleoverflaten, blir komplekset internalisert ved endocytose og setter i gang en intracellulær reaksjon, ofte etter en fosforylering av reseptoren (Sibley et al, Cell 48 (1987) 913-922). Disse intracellulære signaler resulterer i spesifikk gen-transkripsjon og endelig i DNA-syntese og celledeling (replikasjon).

Det er stor interesse for CSF'er, siden de har et terapeutisk potensial som består av en normalisering av nedsatte nivåer av hematopoetiske og lymfoide stamcellebeslektede celler.

Human IL-3 ("hIL-3") er slik en CSF. Moden hIL-3 består av 133 aminosyrer; proteinet inneholder én disulfidbro og har to potensielle glykosyleringssteder (Yang et al., Cell 47 (1986) 3-10). Det har inter alia de følgende aktiviteter:

- 1) stimulering av kolonidannelse av humane hematopoetiske forstadieceller der koloniene som blir dannet inkluderer erytroider, granulocytter, megakaryocytter, granulocyttmakrofager, og blandinger av disse;
- 2) stimulering av DNA-syntese av human-akutt-myelogen leukemi (AML)-blaster.

Anvendbare agonister og antagonist av et protein kan bli laget når struktur-funksjonrelasjonen til molekylet er forstått. Generelt, er denne relasjon studert ved å modifisere, erstatte eller fjerne aminosyrer. På denne måten kan informasjon bli oppnådd om viktigheten av hver av aminosyrene for aktiviteten til proteinet. Viktige domener i proteinene kan være det aktive setet, metall og kofaktorbindinge steder, reseptorbindinge steder, aminosyrer som inngår i subenhetinteraksjoner og de antigene determinantene.

Med en gang primærsekvensen til et protein er blitt bestemt, kan forskjellige fremgangsmåter bli benyttet for å studere de ovenfor-nevnte egenskapene. F.eks. hvis primærstrukturen av homologe proteiner fra andre arter er tilgjengelige kan disse sekvensene bli sammenlignet. Konserverte sekvenser er ofte en indikasjon på viktigheten av visse aminosyrer.

Sekundære strukturer kan bli antatt med bruk av kjente algoritmer. Se, f.eks. Hopp og Woods, Proc. Natl. Acad. Sci USA 78 (1981) 3824-3828, Garnier et al., J. Mol. Biol. 120 (1978) 97-120, Biou et al., Prot. Eng. 2 (1988) 185-191, Cármenes et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 159 (1989) 687-693.

Hvis homologien mellom artene er høy for homologe proteiner og den 3-D-strukturen av én av dem er kjent, kan viktige aminosyrer også bli avledet fra denne strukturen.

Primær og/eller romlig-strukturdata kan bli benyttet for å utføre en kvalifisert gjetning for mutageneseksperimentet.

Uttrykking av mutageniserte proteiner og testingen av disse mutantene i biologiske metoder gir informasjon om den relative viktigheten av visse aminosyrer.

Formålet med den foreliggende oppfinnelse er å skape IL-3-mutanter eller analoger med lignende eller forbedrede farmasøytiske egenskaper med hensyn til det naturlige IL-3, fortrinnsvis ved bruk av fremgangsmåtene nevnt ovenfor.

Relevant litteratur

Human interleukin-3

I 1984, ble cDNA-kloner som kodet for murin IL-3 isolert (Fung et al., Nature 307 (1984) 233-237 og Yokota et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 1070-1074). Dette cDNA ville ikke hybridisere med human DNA eller cDNA-kloner. Derfor ble det spekulert at en human form for murin IL-3 (mIL-3) ikke eksisterte. Denne tro ble bestyrket ved det vide spektrum av aktiviteter til human GM-CSF. Endelig, ga i 1986 et ape-cDNA-ekspresjonsbibliotek sekvensen for gibbon IL-3. Denne sekvens ble deretter benyttet som en probe mot et humant genomisk bibliotek. Dette ga holdet punktet for tilstedeværelsen av IL-3 i mennesker (Yang et al., Cell 47 (1986) 3-10).

I mellomtiden, Dorssers et al., Gene 55 (1987) 115-124, fant en klon fra et humant cDNA-bibliotek som overraskende hybridiserte med mIL-3. Denne hybridisering var resultatet av den høye grad av homologi mellom 3'-ikkekodende regioner fra mIL-3 og hIL-3.

Modifiserte CSF'er (andre enn IL-3)

Moonen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 4428-4431 beskriver fremstillingen av human GM-CSF fra flere rekombinante kilder inklusive E. coli, gjær og dyreceller. Delvis rensede ekspresjonsprodukter fra gjær og dyreceller ble undersøkt for effekten av deglykosylering. Immunoreaktiviteten var øket 4 til 8 ganger når de N-bundete oligosakkaridene var fjernet. Den spesifikke biologiske aktiviteten var øket ved en faktor på 20 både ved kronisk-myelogen-leukemi (CML) og i den humane benmargs-analyse.

Kaushansky et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1213-1217, forsøkte å definere region(er) i GM-CSF-polypeptidet som var nødvendig for biologisk aktivitet. Siden humant og gnager GM-CSF ikke kryssreagerer i deres respektive kolonidannende metoder var fremgangsmåten basert på bruken av hybrid DNA-molekyler som inneholder forskjellige lengder av de kodende regioner for h- og mGM-CSF. Etter uttrykking i COS-celler, ble de hybride proteinene testet i både humane og gnagerkoloni-dannende analyser. To regioner i GM-CSF ble funnet å være kritiske med hensyn til hematopoetisk funksjon. Disse regioner er strukturelt karakterisert av en amfifil heliks og ved en disulfid-bundet sløyfe.

Gough et al., Eur. J. Biochem. 169 (1987) 353-358, beskriver intern delesjon (mangel) mutanter av murin GM-CSF. Ingen av mutantene er referert å vise biologisk aktivitet.

Kuga et al., Biochem. Biophys. Res. Com. 159 (1989) 103-111, beskriver mutagenese av human G-CSF. Resultatene indikerer at mesteparten av de lagde produkter med mutasjoner lokalisert i de interne eller C-terminale regioner fjerner hG-CSF-aktivitet. På den annen side beholdt N-terminale mangelmutanter som mangler 4, 5, 7 eller 11 aminosyrer av et total på 174 aminosyrer, sin aktivitet. Noen av de N-terminale aminosyremutantene viste øket aktivitet.

Delesjonsmutanter av human interleukin-1 (IL-1) er blitt laget ved bruk av tilgjengelig endonukleaserestriksjonsseter og produksjon i eukaryote celler. Den karboksylterminale tredjedel (63 aminosyrer) av polypeptidet inneholder det aktive setet (Makino et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 7841-7845). En nylig studie av hhv. IL-1 α og IL-1 β viste at 140 og 147 aminosyrer (av et total på 153 aminosyrer), er krevet for full biologisk aktivitet (Mosley et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 4572-4576). Enkeltaminosyreforandringer i begge ender resulterte i en betydelig nedgang i biologisk aktivitet. Imidlertid har ikke noe detaljert informasjon med hensyn til den reseptorbindende region i IL-1 blitt oppnådd fra disse studier.

Aktivitet av human interleukin-2 var vist å bli alvorlig hemmet ved fjernelse av både Cys⁵⁸ og Cys¹⁰⁵, mens fjernelse av den tredje cys-resten (125) hadde ingen effekt (Wang et al.,

Science 224 (1984) 1431-1433; Cohen et al., Science 234 (1986) 349-352). Alle substitusjoner (erstatninger) som resulterte i en forstyrrelse av den helikale folding av dette proteinet ble funnet å gi betydelige reduksjoner i biologisk aktivitet. Det potensielle reseptorbindende setet til IL-2 er blitt kartlagt å være på en 11 aminosyre lang peptid. Individuelle aminosyreerstatninger i denne regionen har dramatiske effekter (Cohen et al. (supra); Zurawski og Zurawski, EMBO J. 7 (1988) 1061-1069). Mutasjonsanalyse viste videre at forskjellige regioner i IL-2 er innblandet i høy og lav affinitetsbinding i IL-2-reseptorkomplekset (Robb et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 5654-5658; Collins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988) 7709-7713).

Det kan bli konkludert at modifikasjoner i CSF'er resulterer generelt i dramatiske forandringer i den biologiske aktiviteten til disse molekylene, f.eks. human G-CSF mister dens aktivitet etter at interne eller C-terminale mutasjoner er blitt laget. N-terminale mangler i human G-CSF på opp til 11 aminosyrer (av 174 aminosyrer) affiserer ikke aktiviteten på en uheldig måte, det samme gjelder for IL-1 der minst 140 av 153 aminosyrer er krevet for full aktivitet. Det er klart at færre enn 10% av aminosyrene kan bli fjernet i disse molekylene.

Modifisert IL-3

Clark-Lewis et al., Science 231 (1986) 134-139, gjorde en funksjonell analyse av syntetisk gnager IL-3-analoger. De konkluderte at den stabile tertiære struktur i det komplette molekyl var nødvendig for full aktivitet. En studie over rollen til disulfidbroene viste at erstatning av to av de fire Cys-restene med Ala (Cys⁷⁹, Cys¹⁴⁰ -> Ala⁷⁹, Ala¹⁴⁰) resulterte i en øket aktivitet (Clark-Lewis et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 7897-7901).

Litteratur vedrørende foreslåtte modifikasjoner av hIL-3 er mangelfull. Litteratur vedrørende virkelig utførte modifikasjoner av hIL-3 er enda mer mangelfull. Internasjonal patentsøknad (PCT) WO 88/00598 beskriver en 'naturlig opptreden' Ser²⁷ -> Pro²⁷ erstatning. (Det bør bemerkes at nummereringen av aminosyrer i WO 88/00598 inkluderer signalpeptidet på 19 aminosyrer). Videre forslag er gjort for å erstatte Cys ved Ser, derved brytes disulfid-

broen, og å erstatte én eller flere aminosyrer på glykosylerings-setene, Asn³⁴Cys³⁵Ser³⁶ og Asn⁸⁹Ala⁹⁰Ser⁹¹.

EP-A-0275598 (WO 88/04691) beskriver at Ala¹ kan bli fjernet med bibehold av biologisk aktivitet. Noen mutante hIL-3-sekvenser er beskrevet, slik som to dobbelmutanter, Ala¹ -> Asp¹, Trp¹³ -> Arg¹³ (pGB/IL-302) og Ala¹ -> Asp¹, Met³ -> Thr³ (pGB/IL-304) og én trippelmutant Ala¹ -> Asp¹, Leu⁹ -> Pro⁹, Trp¹³ -> Arg¹³ (pGB/IL-303) (nummereringen starter med den første aminosyre i det modne proteinet.)

WO 88/05469 beskriver hvordan deglykosyleringsmutantene nevnt ovenfor kan bli oppnådd og også mutanter av Arg⁵⁴Arg⁵⁵ og Arg¹⁰⁸Arg¹⁰⁹Lys¹¹⁰ (omgjort til den samme nummerrekkefølge som i EP-A-0275598). Den sistnevnte er antydnet for å unngå proteolyse ved produksjon i Saccharomyces cerevisiae av KEX2 protease. Ingen muterte proteiner er beskrevet. Glykosylering og KEX2-protease-aktiviteten er bare viktig, i denne sammenheng, for produksjon i gjær.

Endelig, EP-A-0282185 nevner forskjellige mutanter som kan være nøytrale med hensyn til konformasjon (struktur) og antigenisitet. For å oppnå dette blir en serie av synonyme aminosyresubstitusjoner nevnt. De foreslåtte aminosyreforandringer er siktet på å holde strukturen og ladningsfordelingen av IL-3-molekylet uforandret. De eneste virkelig utførte mutasjoner er Met² -> Ile² og Ile¹³¹ -> Leu¹³¹. Det er heller ikke beskrevet hvorvidt de ønskede nøytraliteter er oppnådd.

Ingen kjente omfattende mutageneseksperimenter på hIL-3 er blitt beskrevet pr. i dag.

Den foreliggende oppfinnelse beskriver to nye klasser av farmakologisk interessante forbindelser, dvs. delesjonsmutanter og erstatningsmutanter av hIL-3, som viser biologiske aktiviteter som er lik og i visse tilfeller antagonistiske til de som hIL-3 har.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

En utførelsesform av oppfinnelsen omhandler DNA-fragmenter som koder for polypeptidanaloger av interleukin-3 (også referert til heretter som "hIL-3 mutanter" eller "muteiner") med følgende sekvens:

Ala Pro Met Thr Gln⁵ Thr Thr Pro Leu Lys¹⁰
 Thr Ser Trp Val Asn¹⁵ Cys Ser Asn Met Ile²⁰
 Asp Glu Ile Ile Thr²⁵ His Leu Lys Gln Pro³⁰
 Pro Leu Pro Leu Leu³⁵ Asp Phe Asn Asn Leu⁴⁰
 Asn Gly Glu Asp Gln⁴⁵ Asp Ile Leu Met Glu⁵⁰
 Asn Asn Leu Arg Arg⁵⁵ Pro Asn Leu Gln Ala⁶⁰
 Phe Asn Arg Ala Val⁶⁵ Lys Ser Leu Gln Asn⁷⁰
 Ala Ser Ala Ile Glu⁷⁵ Ser Ile Leu Lys Asn⁸⁰
 Leu Leu Pro Cys Leu⁸⁵ Pro Leu Ala Thr Ala⁹⁰
 Ala Pro Thr Arg His⁹⁵ Pro Ile His Ile Lys¹⁰⁰
 Asp Gly Asp Trp Asn¹⁰⁵ Glu Phe Arg Arg Lys¹¹⁰
 Leu Thr Phe Tyr Leu¹¹⁵ Lys Thr Leu Glu Asn¹²⁰
 Ala Gln Ala Gln Gln¹²⁵ Thr Thr Leu Ser Leu¹³⁰
 Ala Ile Phe

og er karakterisert ved at sekvensen koder for aminosyrene 116-133, 120-130, 130-133 eller 120-133, eventuelt også aminosyrene 1-14 er deletert.

De foretrukne DNA-fragmenter er de som har én sekvens hvor aminosyrene 1-14 er deletert. Andre DNA-fragmenter ifølge oppfinnelsen er karakterisert ved en intern delesjon i en region valgt fra gruppen bestående av aminosyrene fom. 20 tom. 30, fom. 47 tom. 54, fom. 54 tom. 61, fom. 60 tom 70, fom. 66 tom. 80, fom. 76 tom. 83, fom. 85 tom. 90, fom. 89 tom. 95, fom. 94 tom. 102, fom. 103 tom. 111, fom. 107 tom. 119.

I en annen utførelsesform av denne oppfinnelsen er DNA-fragmentene som koder for et biologisk aktivt polypeptid analogt med human IL-3 med minst en av de følgende substitusjoner:

Asp36	- > Arg36
Glu43Asp44	- > Lys43Arg44
Arg54Arg55	- > Glu54Asp55
Asp46	- > Lys 46 eller Arg46
Glu50	- > Lys50 eller Arg50
Glu59	- > Lys59 eller Arg59
Arg63Ala64	- > Pro63Gly64
Glu75	- > Arg75 eller Gly75
Lys79	- > Glu79
Arg94	- > Pro94

His98Lys100Asp101	- >	Glu98Asp100Gln101
Glu106	- >	Lys106
Arg108Arg109Lys110	- >	Glu108Asp109Glu110
Phe113Tyr114	- >	Ala113Thr114
Cys16	- >	Ala16
Cys84	- >	Ala84
Cys16Cys84	- >	Ala16Ala84.

I enda en annen utførelsesform av denne oppfinnelsen, blir erstatningsmutanter i hIL-3 beskrevet fremstilt som er mer potente med hensyn til reseptorbinding enn i stimulering av DNA-syntese, således blir antagonistisk beskrevet. Mer spesifikt, er disse enkle eller doble Cys-mutanter. Det er å foretrekke at Cys blir erstattet av Ala (Cys¹⁶ -> Ala¹⁶, Cys¹⁶Cys⁸⁴ -> Ala¹⁶Ala⁸⁴). Andre mutanter som har en antagonistisk effekt er Glu⁵⁰ -> Lys⁵⁰ og Lys⁷⁹ -> Glu⁷⁹.

De nevnte polypeptider blir oppnådd ved å uttrykke passende modifiserte DNA-sekvenser ifølge oppfinnelsen. Til dette tilveiebringer den foreliggende oppfinnelse også passende produksjonsvektorer (ekspresjonsvektorer) og vertsceller som er transformert med disse.

I ytterligere en annen utførelsesform, er oppfinnelsen karakterisert ved fremgangsmåte for fremstilling av aktive peptid-analoger av hIL-3 under anvendelse av DNA-sekvensene ifølge kravene 1-4 som beskrevet ovenfor.

Disse og andre sider vil det bli gjort rede for videre i den følgende detaljerte beskrivelsen.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Figur 1 viser nukleotid og translatert aminosyresekvens av fusjonsproteininnsettingen av pGB/IL-336. Aminosyre benevnt med mindre type bokstaver er non-hIL-3 aminosyrer, IL-3-proteinsekvensen starter ved Ala 1.

Figur 2 viser 5' og 3' sekvensforandringer introdusert for å oppnå pGB/IL-339. Som i figur 1 er små bokstavskrevde aminosyrer ikke hIL-3-aminosyrer, den modne IL-3-proteinsekvensen starter ved Ala 1.

Figur 3 er et fotografi av polyakrylamidgelen fra de følgende 19 IL-3 mutanter (hhv. spor 1 til 19): pGB/IL-336, pGB/IL-339, 932, 810, 934, 812, 935, 813, 936, 820, 937, 821, 938, 822, 939, 9329, 904, 905, 9045; og Pharmacia LMW-markører (spor 20). Mutasjoner som korresponderer med disse tallene er gitt i tabell 4.

Figur 4 viser en AML-prolifiseringsmetode for IL-3 (*) og IL-3 mutant 821 (·).

Figur 5 viser et IL-3-reseptorbindingseksperiment. Radioaktivt merket IL-3-binding til pasient AML-blaste blir konkurrert med umerket IL-3-protein (referansepreparat). Nivåene av ikke-spesifikk (nedre stolpe) og maksimal total binding (øvre stolpe) i dette eksperimentet er indikert (se eksempel 5).

Figur 6 viser en sammenligning av selekterte mutant IL-3 proteiner med hensyn til relativ biologisk aktivitet (åpne stolper) og relativ bindingsaktivitet (fylte stolper). Prosent aktivitet sammenlignet med referanse IL-3 preparat er indikert (tabell 4).

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

Human IL-3 korresponderer her til aminosyre (1-133) som vist i figur 1. Naturlig forekommende varianter er også inkludert. Videre, er hIL-3 molekyler som er modifisert post-translasjonelt (f.eks. glykosylering) også omfattet av betegnelsen IL-3. Med derivater av IL-3 er ment ethvert IL-3 molekyl som har blitt kjemisk eller enzymatisk modifisert, slik at det beholder minst en del av dens biologiske aktivitet.

Analoger av humant IL-3 slik det er benyttet her angir molekyler som har en sekvens som adskiller seg fra det modne IL-3 ved én eller flere delesjoner eller substitusjoner.

Human IL-3 er videre karakterisert ved dens biologiske aktivitet til å stimulere kolonidannelse av humane hematopoetiske forstadiaceller. Koloniene som blir dannet inkluderer erytroider, granulocytter, megakaryocytter, granulocyttmakrofager og blandinger av disse. Den biologiske aktiviteten til hIL-3 kan (for det foreliggende formål) bli videre delt opp i to deler; signaloverføring og reseptorbinding.

Med en hIL-3-analog, som viser forbedrede egenskaper mener vi at analogen har et bedre signaloverføring/reseptorbindingsforhold. Betegnelsen "bedre" er avhengig av de ønskede egenskapene. F.eks. en høyere bindingskoeffisient for en antagonist eller en lik eller høyere biologisk aktivitet for en delesjonsmutant. Bedre kan også bety at polypeptidanalogen har mindre tendens til å danne aggregater.

For det foreliggende formål blir den (biologiske) aktiviteten til de humane IL-3-analoger bestemt ved DNA-syntese av humane akutte myelogene-forstadier (blaster). Videre blir reseptor-bindingsmetoder utført med donorleukocytter, pasient AML-celler eller MV4-11-celler.

IL-3 er aktiv i både reseptorbinding og signaloverføring. Hvis det ville være mulig å tilskrive disse aktivitetene til spesifikke aminosyresekvenser, som kan være enten kontinuerlige eller diskontinuerlige, ville det være mulig å avkoble bindingen fra signaloverføringsaktivitetene. På den måte vil det være mulig å produsere spesifikke IL-3-reseptorantagonister.

Som et første trinn for å oppnå disse mål er en fast forståelse av struktur-funksjon-forholdet til hIL-3 nødvendig. Egenskapene av det naturlig forekommende eller naturlig muterte IL-3 kan være forandret ved å innføre en rekke mutasjoner i proteinet. Slike forandringer er passende innført ved bruk av mutageneseteknikker beskrevet herved og de muterte molekylerne (hIL-3-muteiner) er på passende måte syntetisert ved bruk av ekspresjonsvektorer som er beskrevet. For å bestemme struktur-funksjonrelasjonen er de følgende mutageneseteknikker inter alia å vurdere:

- a) erstatning av én aminosyre ved en isosterisk rest av forskjellig funksjon f.eks. Asp ved Asn. Dette opprettholder hydrogenbindingskarakteristika, mens ladningen fjernes;
- b) erstatning av én aminosyre ved en annen av identisk funksjon, men forskjellig struktur f.eks. Glu ved Asp, hvor en karboksylgruppe vil bli flyttet omkring 1Å;
- c) erstatning av én aminosyre med en annen med forskjellig funksjon;
- d) innføring eller fjerning av disulfidbroer;
- e) konstruksjon av delesjonsmutanter;

- f) innføring av heliksbrytere (f.eks. Pro);
- g) konstruksjon av innskudd(insertion)mutanter;
- h) utvikling av glykosyleringsmutanter.

En side av den foreliggende oppfinnelse er fremstillingen av en spesifikk antagonist som blokkerer reseptoren ved å bindes spesifikt til den, fortrinnsvis med en høy bindingskoeffisient, og derved hindre signaloverføringen.

En antagonist kan være ethvert kjemisk molekyl som binder til reseptoren og derved unngår binding av agonisten. Den foreliggende oppfinnelse sikter spesifikt mot fremstilling av proteiner som har en slik blokkerende effekt. I én av sine utførelsesformer, fremstilles ifølge den foreliggende oppfinnelsen hIL-3-muteiner som kan ha minst en delvis antagonistisk effekt. Mer spesifikt, er disse enkle eller doble Cys-mutanter. Fortrinnsvis, blir Cys erstattet av Ala (Cys¹⁶ -> Ala¹⁶, Cys¹⁶Cys⁸⁴ -> Ala¹⁶Ala⁸⁴). Andre mutanter som har en antagonistisk effekt er Glu⁵⁰ -> Lys⁵⁰ og Lys⁷⁹ -> Glu⁷⁹. Det kan bli forutsagt at tilførsel av en betydelig dose av de ønskede mutantene vil forhindre bindingen av den fysiologisk tilgjengelige IL-3, og derved vise dets antagonistiske aktivitet.

I en annen utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse, fremstilles det proteiner som har hIL-3 eller hIL-3-lignende aktivitet, som er mindre, fortrinnsvis fra omkring 3 til omkring 25%, enn det native hIL-3-molekyl. Som videre illustrert ved eksemplene kan det bli utført ved å introdusere spesifikke delesjoner i den delen av molekylet som er uerstattelig med hensyn til reseptorbinding og signaloverføring.

I en ytterligere utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse er aminosyrer erstattet, dette tillater identifikasjonen av aminosyrer som er viktige i reseptorbinding og/eller i signaloverføring.

To slags mutanter er spesifikt blitt laget;

- a) delesjonsmutanter og b) substitusjonsmutanter. Det skal forstås at kombinasjoner av disse mutanter kan lett bli oppnådd ved de nevnte metodene.

Delesjonsmutanter er blitt laget, som sammen dekker nærmest den fullstendige kodende regionen. Delesjoner slik det brukes her

kan være delesjon av enhver aminosyre eller minst to etterfølgende (eller adskilte) aminosyrer. Fortrinnsvis kan fire eller flere aminosyrer bli fjernet. Nevnte delesjoner kan starte med enhver aminosyre i molekylet (bortsett selvfølgelig nær C-terminalen). Det er også mulig å ha to adskilte delesjoner i molekylet (f.eks. to ganger én aminosyredelesjon, to ganger to osv.). I én av de mest foretrukne utførelsesformer er 32 aminosyrer fjernet, 14 i den N-terminale og 18 i den C-terminale del av proteinet. Overraskende viste alle av de produserte delesjonsmutantproteinene spesifikk IL-3 biologisk aktivitet, skjønt i meget sterkt redusert grad. Derfor kan det bli konkludert at det er ikke et enkelt kontinuerlig peptidområdet på proteinet som binder reseptoren.

Fire av mutantene, den N-terminale delesjonsmutanten som mangler aminosyrene 1-14, den C-terminale delesjonsmutanten som mangler aminosyrene 120 til 130, den dobbelte mutant av disse og den C-terminale mutanten 130-133, viste biologisk og bindingsaktivitet som er nær den til det native IL-3-molekylet. Det er overraskende at hIL-3 som mangler opp til 25 aminosyrer (omkring 20% av den fulle lengde hIL-3) beholder fremdeles sin fulle aktivitet. I lys av Cys¹⁶ som er involvert i dannelsen av en disulfidbro er det å vente at en -15 N-terminal delesjonsmutant beholder dens fulle aktivitet. De doble delesjonsmutantene som mangler de 14 N-terminale og opp til 18 C-terminale aminosyrer (tabell 4, X og Z) beholder fremdeles den fulle aktivitet. Slike mutanter, som mangler opp til 32 aminosyrer mangler i det meste omtrent 25% av det opprinnelige molekylet. Siden denne doble mutanten beholder full aktivitet er det å forvente at den -18 C-terminale mutanten vil også være fullt aktiv.

Mutanter som har bare interne delesjoner også blitt laget. En intern delesjonsmutant med fullstendig beholdt aktivitet er beskrevet fremstilt ifølge denne oppfinnelse, denne mutant mangler aminosyrene 120 til 130 (tabell 4, 939). Det er sannsynlig at flere slike mutanter kan bli laget. Av prosesseringsgrunner kan det være fordelaktig å beholde de første få aminosyrene av det modne IL-3-protein. Siden -14 N-terminal delesjonsmutanten beholder full aktivitet er det ventet at en intern delesjonsmutant i den N-terminale regionen også vil beholde sin aktivitet. En annen region hvor en mangel kunne bli innført på en heldig måte

synes å være i Gln²⁹ - Leu³⁵ regionen. Fjernelse av 1 til 7 aminosyrer, muligens i kombinasjon med en Lys²⁸ → Pro²⁸ substitusjon kan gi en annen type av interne delesjonsmutanter.

Oppdagelsen at aktiviteten til hIL-3 er beholdt i de beskrevne dobbeltmutantene eller for enhver mutant som mangler store deler av proteinet (f.eks. omtrent 25%) har en annen potensiell fordel. En farmasøytisk blanding som inneholder hIL-3 kan bli gitt parenteralt, intravenøst eller subkutant. Bruken av en hydrogel bestående av biodegraderbar polymer som omslutter polypeptidet og som kontinuerlig frigjør nevnte polypeptid er begrenset av mengde peptid som kan bli omsluttet. Bruk av en delesjonsmutant av polypeptidet med høyere spesifikk aktivitet betyr at på molar basis kan mer av den aktive forbindelse bli omsluttet i det samme volumet og derved øke tiden mellom vellykkede tilføringer eller muligens unngå gjentatte tilførsler.

Substitusjonsmutanter er blitt laget ved å innføre spesifikke mutasjoner på DNA-nivået og derved introdusere aminosyre-erstatninger inn i det kodede protein. Disse substitusjoner kan bli innført i regioner som er viktige for konformasjonen eller aktiviteten til proteinet. Et eksempel på en slik mutasjon er en mutasjon som forstyrrer disulfidbroen som er tilstede mellom Cys¹⁶ og Cys⁸⁴. Ved å erstatte den ene (eller begge) av cysteinrestene med en alanin kan ikke broen bli dannet, og dette resulterer i en sterkt nedsatt aktivitet. Alle tre mulige mutanter er blitt fremstilt og de viser en relativ høy bindingsaktivitet (sammenlignet med biologisk aktivitet) i en reseptorbindingsmetode. Siden forskjellige forhold med relativ bindingsaktivitet til relativ biologisk aktivitet (tabell 4) er funnet kan det være fordelaktig å benytte kombinasjoner av de beskrevne IL-3-analogene. Videre kan det være fordelaktig å benytte polypeptidanaloger som har én eller flere mangler og én eller flere erstatninger.

Brudd på disulfidbroen resulterer i en vesentlig forandring i 3D-strukturen til vedkommende protein. Også andre aminosyre-erstatninger vil også influere denne struktur og derfor aktiviteten.

Sekundærstrukturmålinger (sirkulær dikroisme) viser at hIL-3-molekylet har en høy prosentdel (70% ved 20°C) av α -helikser.

Sekundærstrukturprediksjonsprogrammer (f.eks. Hopp og Woods, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 3824-3828, Garnier et al., J. Mol. Biol. 120 (1978) 97-120, Biou et al., Prot. Eng. 2 1988) 185-191, Cármenes et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 159 (1989) 687-693) antyder at disse α -helikser er lokalisert mellom de følgende aminosyrer Met¹⁹ - His²⁶, Gly⁴² - Arg⁵⁵, Leu⁵⁸ - Glu⁶⁹, Ala⁷¹ - Leu⁸¹, Leu⁸⁷ - His⁹⁵, His⁹⁸ - Leu¹¹¹ og Leu¹¹⁵ - Ala¹²¹.

I lys av ladningsfordelingen i α -helikser og siden det er mulig at disse ladninger spiller en viktig rolle i reaksjonen med reseptoren er DNA-fragmenter med de følgende "ladningsreversering" substitusjoner også omfattet av den foreliggende oppfinnelse:

Asp ³⁶	->	Arg ³⁶
Glu ⁴³ Asp ⁴⁴	->	Lys ⁴³ Arg ⁴⁴
Arg ⁵⁴ Arg ⁵⁵	->	Glu ⁵⁴ Asp ⁵⁵
Asp ⁴⁶	->	Lys ⁴⁶ eller Arg ⁴⁶
Glu ⁵⁰	->	Lys ⁵⁰ eller Arg ⁵⁰
Glu ⁵⁹	->	Lys ⁵⁹ eller Arg ⁵⁹
Arg ⁶³ Ala ⁶⁴	->	Pro ⁶³ Gly ⁶⁴
Glu ⁷⁵	->	Arg ⁷⁵ eller Gly ⁷⁵
Lys ⁷⁹	->	Glu ⁷⁹
Arg ⁹⁴	->	Pro ⁹⁴
His ⁹⁸ Lys ¹⁰⁰ Asp ¹⁰¹	->	Glu ⁹⁸ Asp ¹⁰⁰ Gln ¹⁰¹
Glu ¹⁰⁶	->	Lys ¹⁰⁶
Arg ¹⁰⁸ Arg ¹⁰⁹ Lys ¹¹⁰	->	Glu ¹⁰⁸ Asp ¹⁰⁹ Glu ¹¹⁰
Phe ¹¹³ Tyr ¹¹⁴	->	Ala ¹¹³ Tyr ¹¹⁴

Både delesjon- og substitusjonsmutanter kan bli benyttet for å forandre glykosyleringssetene. Således kan produksjonen av glykosylerte eller ikke-glykosylerte polypeptider i eukaryote vertsceller utføres etter ønske.

Mutantene beskrevet ovenfor ble benyttet i epitopkartleggings-eksperimenter for å bestemme hvor utsatte segmenter i molekylet, som kan være relevant i reseptorbinding, er lokaliserte. For å oppnå dette, ble monoklonale antistoffer laget mot modent hIL-3. Deretter, ble disse antistoffene benyttet i western blotting eksperimenter ved bruk av muterte proteiner. Minst ett antigen fragment kunne bli oppdaget.

De nye hIL-3-mutantene fremstilt ifølge den foreliggende oppfinnelse er praktisk laget ved sete-rettet mutagenese, men en rekke andre teknikker, som er kjent i feltet å kunne modifisere proteiner, kan også bli benyttet.

Passende vektorer som er i stand til å transformere mikroorganismer, som kan uttrykke de muterte DNA-sekvensene som koder for de ønskede hIL-3 mutantene, inkluderer ekspresjonsvektorer karakterisert ved nevnte muterte sekvenser som er avledet fra den modne hIL-3 kodende sekvensen, koblet til produksjonsregulerende regioner og terminator(avslutnings)regioner. Disse regioner er valgt avhengig av de prokaryote eller eukaryote celler som blir benyttet som vertsceller. Fortrinnsvis blir E. coli eller Bacillus benyttet som vertsceller. Imidlertid kan også sopp, gjærceller og vevskulturceller bli benyttet (se EP-A-0275598).

Produksjons(ekspresjons)vektorer for E. coli inkluderer pGB/IL-336 og pGB/IL-339, hver inneholder lacZ-promotoren, og for Bacillus pGB/IL-322, som inneholder α -amylasepromotoren og signalpeptidet, og derivater av disse. Andre passende vektorer for produksjon i Bacillus er, f.eks., HpaII-promotor inneholdende vektorer og derivater av disse. Disse og andre vektorer er alle beskrevet i EP-A-0275598 og EPA 90200624.6 (registrert 15. mars 1990, basert på de følgende prioritetene: EPA 8920066.2 registrert 15. mars, 1989 og EPA 89201967.0 registrert 25. juli 1989).

For letthets skyld kan det være nyttig å benytte produksjonskonstruksjoner som er i stand til å utskille proteinet fra vertscellen. Dette er f.eks. gjort i Bacillus konstruksjonene som er benyttet. Isolering fra inklusjonslegemer, som eksemplifisert her i E. coli er også mulig.

Rensing av polypeptidet som er oppnådd etter produksjon er avhengig av vertscellen og vertscellekonstruksjon som er benyttet. Generelt, kan rensingen av hIL-3-muteiner bli utført på samme måte som opprensingen av nativt hIL-3. For å oppnå høyt rensset hIL-3-muteiner kan de følgende trinn bli benyttet; hydrofob interaksjonskromatografi, etterfulgt av anionbytterkromatografi og valgfritt fulgt av gelfiltrering. Det kan også være tilstrekkelig å benytte bare én eller to av disse rensetrinnene (en detaljert beskrivelse av rensingen av hIL-3 er beskrevet i EPA 90200624.6 registrert 15. mars 1990, basert på de følgende prioritetene: EPA 89200660.2

registrert 15. mars 1989 og EPA 89201967.0 registrert 25. juli 1989).

I korthet, ble som et første trinn isolert inklusjonslegemene som inneholdt proteinet etter produksjon i E. coli. Etter sonikering i 8 M urea ble proteinet videre rensset ved å utføre anionebytterkromatografi. Etter fjernelse av urea, ga filtersterilisering et protein som ble benyttet til etterfølgende biologisk og biokjemisk karakterisering. Bruken av Bacillus som en vertscelle, i kombinasjon med sekresjon av polypeptidene, ga meget rene polypeptider etter kombinasjonen av hydrofob interaksjon og anionebytterkromatografi. Videre, er det klart at mutanter som har forandret ladning kan vise forskjellige fysikalske egenskaper, som krever spesiell elueringsbetingelser eller andre søylematerialer enn de som er spesifikt benyttet i eksemplene.

De rensede muteinene kan bli formulert i farmasøytiske blandinger ved tilsetning av en farmasøytisk akseptert ikke-giftig bærer. Som nevnt ovenfor, kan slike blandinger bli laget for bruk til parenteral (subkutan, intramuskulær eller intravenøs) tilførsel særlig i form av flytende løsninger eller suspensjoner. Blandingene kan passende bli gitt i enhetsdoseform og kan bli laget ved enhver av de metoder som er kjent i det farmasøytiske felt, f.eks., som beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1970. Formuleringer for parenteral tilførsel kan inneholde som vanlige bestanddeler sterilt vann eller saltvann, polyalkylenglykoler slik som polyetylenglykol, oljer av vegetabilsk opprinnelse, hydrogenerte naftalener o.l..

Forbindelsene fremstilt ifølge denne oppfinnelsen kan bli benyttet som det eneste aktive middel i et legemiddel eller kan bli benyttet i kombinasjon med andre aktive ingredienser. Andre aktive ingredienser kan bli valgt f.eks. fra passende hematopoetiner, CSF'er og interleukiner. Disse inkluderer GM-CSF, CSF-1, G-CSF, M-CSF, erytropoetin, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4 til IL-8 og tumornekrosefaktor.

Et antall metoder er tilgjengelige for å måle den biologiske aktiviteten og potensen til hIL-3-analoger i oppfinnelsen. F.eks., kan analogen bli undersøkt ved bruk av teknikker som er vel kjent i feltet, for å undersøke hvis proteinet stimulerer kolonidannelse av humane hematopoetiske stamceller. Koloniene som er dannet

inkluderer erytroider, granulocytter og granulocyttnakrofager. Alternativt, kan egenskapen til en type analoger til å stimulere DNA-syntese i humane akuttmyelogen-leukemi (AML) blaster, bli benyttet for å indikere aktivitet på bakgrunn f.eks. av merket thymidinopptak.

De biologisk aktive polypeptidanalogene av human IL-3 som fremstilt ved den foreliggende oppfinnelse kan bli benyttet for både terapeutiske og diagnostiske formål. Terapeutisk bruk inkluderer behandlingen og prevensjonen av maligne og ikke-maligne sykdommer. P.g.a. de spesielle egenskapene til de presenterte mutantene kan bruksområdet bli forbedret. Bruksområdene inkluderer behandling av:

- cytopenier og/eller immunsuppresjon p.g.a. infeksjoner,
- cytopenier p.g.a. kjemoterapi og/eller stråling,
- bensykdommer slik som benfrakturer og osteoporose,
- immunmangler p.g.a. generelle bedøvelsesanvendelser,
- rekonvalesens etter benmargstransplantasjon,
- tilsetning til vaksinasjon og tilleggsbehandling for infeksjoner.

Oppfinnelsen er videre illustrert av de følgende eksemplene.

EKSPERIMENTELT

EKSEMPEL 1

Konstruksjon av ekspresjons(produksjons)vektorer

Konstruksjon av pGB/IL-336

For å lage et polypeptid som ligner nøye det modne humane IL-3, ble en konstruksjon laget som manglet 5'-ikketranslatert og signalpeptidkodende sekvenser. IL-3-cDNA-innsetningen i pLH1 (se EP-A-0275598) ble kløyyet ut med HincII og HindIII, koblet til et syntetisk oligonukleotid (SalI-overheng/buttendet, 419/420, tabell 1) karakterisert ved sekvensen som kodet for de N-terminale 14 aminosyrene til det modne IL-3 og innsatt i SalI-HindIII kløyyet pTZ18R (Pharmacia). Etter bekreftelse av sekvensen, ble det komplette innskudd overført til pUC8 for proteinproduksjon (som beskrevet tidligere i EP-A-0275598), og dette resulterte i plasmid

pGB/IL-335. For å tillate direkte sekvensering og mutagenese, ble PpvuI-fragmentet av plasmid pTZ18R som inneholdt fl-startstedet for replikasjon benyttet for å erstatte det korresponderende PvuI-fragmentet i pUC8. Det resulterende bakterielle produksjonsplasmid pGB/IL-336 gir opphav til et fusjonsprotein på 145 aminosyrer med en beregnet Mw på 16,384 dalton (fig. 1).

Konstruksjon av pGB/IL-339

Et alternativt produksjonsplasmid ble laget for å underlette effektiv overføring av potensielle interessante mutanter til Bacillus-produksjonsvektorer (se under). For dette formålet ble pGB/IL-336 fordøyet med HpaI og HindIII for å fjerne mesteparten av den 3'-terminale delen i IL-3 cDNA. De overhengende ender ble gjort like lange og deretter ble et buttendet fragment som inneholdt de korresponderende IL-3-sekvensene (nt 137-497) og B. licheniformis alfa-amylaseterminatoren fra plasmid pGB/IL-337 ligert inn i den, hvilket resulterte i plasmid GB/IL-338. pGB/IL-337 ble konstruert fra pGB/IL-324 (som beskrevet i den europeiske patentsøknad nr. 892019670 som er herved innbefattet som referanse) ved utsløyfing av 3' ikke-kodende IL-3 cDNA og alfa-amylase-struktursekvenser mellom IL-3 stoppkodonet i DNA-et og alfa-amylaseterminatoren, ved bruk av et syntetisk oligonukleotid (tabell 1, 944). Dette oligonukleotid innførte også et XhoI-sete like nedstrøms for IL-3-stoppkodonet. Plasmid pGB/IL-338 ble fordøyet med BamHI og HincII og del av polylinkeren og 5'-terminale IL-3 sekvenser ble erstattet av de fosforylerte syntetiske oligonukleotidene 1055/1056 (tabell 1) som ga opphav til plasmid pGB/IL-339. Således ble IL-3-genet rekonstruert med en liten modifisert heterolog kodende sekvens for signalpeptid. Nå blir et fusjonsprotein på 148 aminosyrer med beregnet Mw på 16,541 dalton syntetisert (figur 2). DNA-sekvensen til pGB/IL-339 ble bekreftet og funnet å være korrekt. Den biologiske aktiviteten til det produserte fusjonsprotein var ikke forandret.

En annen E. coli-produksjonsvektor pGB/IL-340 ble konstruert, der er lacZ-promotoren etterfulgt av sekvenser som koder for Bacillus alfa-amylasesignalpeptidet som er presist koblet til modent IL-3, med amylaseterminatoren nedstrøms for denne. Dette plasmid, som også tjener som et mellomledd for konstruksjonen av

Bacillus-produksjonsvektorer, ble konstruert ved å innføre NdeI-KpnI-fragmentet fra pGB/IL-337, som hadde alle sekvensene som nettopp ble nevnt, inn i NdeI-KpnI spaltet E. coli-vektor pTZ18RN. pTZ18RN er pTZ18R (Pharmacia) som er litt modifisert oppstrøms for lacZ ATG startkodon for å innføre et NdeI-sete, ved bruk av oligonukleotid 731 (se tabell 1). pGB/IL-340 gir opphav til høy produksjon av IL-3 i E. coli.

EKSEMPEL 2

Konstruksjon av mangel og erstatningsmutanter

In vitro mutagenese ble utført ved bruk av syntetiske oligonukleotider (tabeller 1 og 2) ifølge fremgangsmåten utviklet av Kunkel et al. (1987) Meth. Enzymol. 154 367-382. Enkeltstrengt templat DNA ble laget ved å transformere E. coli-stammen CJ236 (BioRad) med pGB/IL-336 eller pGB/IL-339 DNA og superinfeksjon med M13K07 (Pharmacia) hjelpefag. Fag DNA ble laget ifølge standard-fremgangsmåter og fraksjonert på 0,6% lavsmeltende agarose for å fjerne hjelpefagen ssDNA. Det utskårne bånd ble smeltet og ekstrahert med fenol. pGB/IL-336 eller pGB/IL-339 ssDNA ble gjenfunnet ved butanolkonsentrasjon og etanolpresipitering og testet for primer-avhengig DNA-syntese i en sekvenseringsreaksjon.

Renset pGB/IL-336 eller pGB/IL-339 ssDNA ($\pm$ 100 ng) ble koblet til 20 ng fosforylert primer ved 65°C og avkjølt langsomt til romtemperatur. Syntese av den komplementære streng ble utført ved bruk av 1-2 μ g gen 32 protein, 4 enheter av T4-DNA-polymerase og 2,5 enheter av T4-DNA-ligase. Reaksjon ble utført ved 0°C i 5 min., ved 20°C i 10 min. og ved 37°C i 90 min.. Etter avslutning, ble en tredjedel av reaksjonsblandingen blandet med tinte kompetente (Hanahan, D. (1985) i: "DNA Cloning" (D. M. Glover ed.) Vol. 1, IRL Press, Washington) JM109 celler og sådd ut. Individuelle kolonier ble plukket og benyttet for å så ut i flytende medium og cellene ble superinfisert med M13K07 hjelpefag for å lage ssDNA. Sekvensen i klonene ble bekreftet ved bruk av M13 revers sekvenseringsprimer og to IL-3-sekvensspesifikke primere (tabell 1; 823: nt 118-137 og 824; nt 261-280).

Den doble cysteinmutanten (9045) ble laget ved ligering av de korresponderende BstBI-BamHI-fragmentene i plasmidet som inneholdt

de muterte IL-3-genene 904 og 905. På lignende måte ble kombinasjonsmutantene X og Z konstruert ved ligering av fragmenter som inneholdt en 5'-delesjon og fragmenter som inneholdt 3'-delesjoner. De resulterende kloner ble undersøkt ved restriksjonsenzymanalyse og sekvensanalyse.

Mutant 9329 ble oppnådd fra 939 etterfulgt av HpaI og BamHI kløyving og kobling med oligonukleotidene 1424/1425. Klonene ble undersøkt først med hensyn til tap av HpaI-setet og deretter for korrekt DNA-sekvens.

Fra alle transformanter, ble plasmid DNA isolert for en annen runde av transformasjon inn i JM109-celler for å ekskludere mulig forurensning med den parentale IL-3-konstruksjonen. Etter sekvensbekreftelse, ble disse klonene benyttet for proteinproduksjon.

Noen av mutantene beskrevet her (811, 933 og 9329) ble satt inn i pGB/IL-340. Dette ble gjort ved å ligere PstI-XhoI-fragmentet av en pGB/IL-339-avlede mutant inn i PstI-XhoI kløyvet pGB/IL-340, og dette resulterte i plasmidene pGB/IL-340/811, pGB/IL-340/933 og pGB/IL-340/9329.

Bacillus-produksjonsvektorer for IL-3-muteiner ble konstruert ved å bytte ut PstI-HindIII-fragmentet i pGB/IL-322 (som bar del av alfa-amylasesignalpeptidet, den komplette modne IL-3 cDNA-sekvens og amylaseterminatoren) med PstI-HindIII-fragmentet i et pGB/IL-340 mutert derivat (som inneholdt del av alfa-amylasesignalpeptidet, den muterte IL-3 cDNA-sekvensen og alfa-amylaseterminatoren). Bacillus-produksjonsvektorene for muteinene 811, 933 og 9329 ble benevnt hhv. pGB/IL-322/811, pGB/IL-322/933 og pGB/IL-322/9329.

En annen mutant (1455 som manglet aminosyrer 130-133) ble konstruert direkte i pGB/IL-340 ved utsløyfings(loop-out)-mutagenese, ved bruk av oligonukleotid 1455 (tabell 1), hvilket resulterte i plasmid pGB/IL-340/1455. Deretter, ble den muterte sekvensen overført til pGB/IL-322 på en lignende måte som beskrevet for mutantene 811, 933 og 9329 hvilket resulterte i plasmid pGB/IL-341.

Tabell 1
Mutageneseoligonukleotider

Kode	Sekvens (5'→3')	Aminosyrer involvert
810	AACTGCTCTAACATGCCTTTGCCTTTGCTG	20-30
811	CACTTAAAGCAGCCAGAAAATAACCTTCGA	31-49
812	ATGGAAAATAACCTTAACAGGGCTGTCAAG	54-61
813	TTCAACAGGGCTGTCCTCCTGCCATGTCTG	66-80
820	AATCTCCTGCCATGTGCACCCACGCGACAT	85-90
821	ACGGCCGCACCCACGGACTGGAATGAATTC	94-102
822	GGTGACTGGAATGAAAATGCGCAGGCTCAA	107-119
932	CGGGGATCCGTCGACAACTGCTCTAACATG	1-14
933	ATAACACACTTAAAGAACCACTCAATGGG	29-37
934	GGGGAAGACCAAGACAGGCCAAACCTGGAG	47-54
935	AGGCCAAACCTGGAGGCATCAGCAATTGAG	60-70
936	GCATCAGCAATTGAGTGTCTGCCCCTGGCC	76-83
937	TGTCTGCCCCTGGCCCAATCCATATCAAG	89-95
938	CATATCAAGGACGGTACGTTCTATCTGAAA	103-111
939	CTGAAAACCCTTGAGGCGATCTTTTGAGTC	120-130

823 CCTTGAAGACAAGCTGGGTT
 824 CCAAACCTGGAGGCATTCAA
 419 TCGACGCTCCCATGACCCAGACAACGCCCTTGAAGACAAGCTGGGTT
 420 AACCAGCTTGTCTTCAAGGGCGTTGTCTGGGTCATGGGAGCG
 731 CAGGAAACACATATGACCATGATT
 944 TGAGCCTCGCGATCTTTTGACTCGAGTAGAAGAGCAGAGAGGACGG
 1055 GATCCTCTGCAGCAGCGGGCGCTCCCATGACCCAGACAACGCCCTTGAAG-
 ACAAGCTGGGTT
 1056 AACCAGCTTGTCTTCAAGGGCGTTGTCTGGGTCATGGGAGCCGCCGCTG-
 CTGCAGAG
 1424 GATCCTCTGCAGCAGCGGCG
 1425 CGCCGCTGCTGCAGAG
 1455 CTCAACAGACGACTTTGAGCTGACTCGAGTAGAAGAGCAGAG

indikerer nukleotid ved siden av delesjonen i IL-3-genet.

Tabell 2Oligonukleotider for substitusjonsmutagenese

Kode	Sekvens (5'→3')	Aminosyrer involvert
904	GACAAGCTGGGTAAACGCTAGCAACATGATCGATGAA	16
905	CTTAAAAATCTCCTGCCGGCGCTGCCCCTGGCCACGG	84
1480	TTGCCTTTGCTGCGCTTCAACAACCTC	36
1481	AACCTCAATGGGAAACGCCAAGACATTCTG	43-44
1482	GGGGAAGACCAACGCATTCTGATGGAA	46
1483	GACATTCTGATGAAAAATAACCTTCGA	50
1484	GAAAATAACCTTGAAGATCCAAACCTGGAG	54-55
1485	AGGCCAAACCTGAAAGCATTC AACAGG	59
1486	GAGGCATTCAACCCGGGCGTCAAGAGTTTA	63-64
1487	GCATCAGCAATT [C/G] GTAGCATTCTTAAA	75
1488	GAGAGCATTCTTGAAAATCTCCTGCCA	79
1489	GCCGCACCCACGCCGCATCCAATCCAT	94
1490	CGACATCCAATCGAAATCGATCAGGGTGACTGGAAT	98-101
1491	GGTGACTGGAATAAATTCCGGAGGAAA	106
1492	TGGAATGAATTCGAAGATGAACTGACGTTCTAT	108-110
1493	AGGAAACTGACGGCGACCCTGAAAACCCTT	113-114

EKSEMPEL 3

Rensing av IL-3-muteiner fra E. coli eller fra Bacillus

E. coli JM109-kulturer (100 ml) ble inokulert med 0,5 ml av en fersk over-natten-kultur av den (muterte) IL-3 klonen og dyrket ved 37°C til en OD på 0,4-0,6 ved 550 nm ble nådd. Plasmid-dirigert proteinsyntese ble startet ved tilsetning av 1 mM av IPTG (Pharmacia). Etter en tilleggsdyrking i 3-16 timer, ble cellene samlet ved sentrifugering (10 min., 4000 rpm ved 4°C) og lagret frosne.

Bakteriene ble suspendert i 10 ml TE (10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA) og lysozym tilsatt (0,025% = 500 µg/ml). Etter inkubasjon i 30 min. ved romtemperatur, ble MgCl₂ og DNase tilsatt til endelig konsentrasjoner på hhv. 10 mM og 20 µg/ml. Etter inkubasjon ved 37°C i 15 min., ble Tween 20 (0,2%) DTT (2 mM) og PMSF (0,1 mM) tilsatt. Suspensjonen ble avkjølt på is og kraftig sonikert (to ganger 35 sek). Homogenatet ble renset ved sentrifugering (30 min. 15.000xg, 10.000rpm i en Beckman JS13.1 rotor) ved 4°C og supernatanten ble kastet.

Bunnfallet ble resuspendert i 4 ml i 55% sukrose i buffer TPD (50 mM Tris-HCl, pH 8; 0,1 mM PMSF og 2 mM DTT) ved sonikering og enten bunnfelt og solubilisert i urea for å måle direkte biologisk aktivitet eller lagt på en diskontinuerlig sukrosegradient (2 ml porsjoner på 75% og 60% sukrose i TPD-buffer), i det vesentligste slik som beskrevet i WO 88/00598. Etter sentrifugering ved 200.000 xg (35.000 rpm i en Sorvall TH641 rotor) ved 25°C i 2 timer, ble inklusjonslegemene som inneholdt IL-3-proteinene gjenvunnet fra 75% sukroseinterfasen.

Etter minst 4 ganger fortynning, ble inklusjonslegemene bunnfelt ved 25.000xg (30 min. ved 13.000 rpm i Beckman JS13.1 rotoren) og ultralydbehandlet i 5 ml 8M urea som inneholdt 50 mM Tris-HCl pH 8,9 og 2 mM DTT og etterlatt over natten ved 4°C. Den rensede løsningen ble deretter satt på en 3 ml DEAE-Sepharose Fast Flow kolonne (Pharmacia), som var ekvilibrert med 8 M urea, 50 mM Tris-HCl pH 8,9 og 1 mM DTT buffer. IL-3-proteinet var bundet til kolonnen og trinnvis eluert med 75 mM NaCl i den samme buffer. Det eluerte proteinet ble dialysert mot flere porsjoner av 10 mM

Tris-HCl pH 8,0 og 1 mM DTT-buffer og gjort isotonisk ved tilsetning av 10 ganger konsentrert RPMI cellekulturmedium (Sigma) som inneholdt 1% bovinserumalbumin. Den filtersteriliserte (0,22 μ m Millex-GV, Millipore) løsningen ble benyttet for biokjemisk og biologisk karakterisering.

De muterte proteinene 811, 933, 1455, 9329, X og Z som ble laget av Bacillus ble utskilt til kulturmediet og krevet ikke slike dramatiske rensefremgangsmåter for testing av biologisk aktivitet. Derfor ble den rensede supernatant (1 liter) (i en justert løsning av 5 mM EDTA, 1 mM PMSF og 1 M ammoniumsulfat) tilsatt en 15-20 ml Fractogel TSK butyl 650 (C) kolonne (Merck) ekvilibrert med 1 M ammoniumsulfat i 10 mM Tris-HCl pH 7,0 buffer. Det bundede IL-3 proteinet ble eluert med 10 mM Tris-HCl-buffer og deretter tilsatt en 1,5 ml DEAE-Sepharose Fast Flow kolonne som var ekvilibrert med 10 mM Tris-HCl pH 8,0 buffer. Gjennomstrømningsvæsken ble samlet og justert til 70% ammoniumsulfat for å konsentrere IL-3-proteinet. Bunnfallet ble samlet ved hjelp av sentrifugering ved 10.000 rpm (JS-13 rotor), løst opp og dialysert mot 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM DTT-buffer.

Prøver som svarte til 25-100 μ l av den opprinnelig bakteriekultur ble undersøkt på 0,75x75x100 mm (BioRad miniprotean II) 13,5% SDS-polyakrylamidgeler (akryl/bisakryl=29/1). Proteinene ble synliggjort ved enten Coomassie brilliant blå G250 farging eller immunologiske metoder. Figur 3 viser et eksempel på rensede muteiner produsert i E. coli.

Produksjonen av mutert pGB/IL-339 modifiserte IL-3-proteiner i E. coli var generelt høyere enn det samme muterte protein fra pGB/IL-336 produksjonsvektoren. Den benyttede rensefremgangsmåte ble ikke oppfunnet for å gi fullstendig rene IL-3-proteinpreparater. Generelt, ble mindre høyere molekylvekturenheter observert på SDS-geler. Ved bruk av densitometrisk undersøkelse av fargede SDS-geler, ble mengden av IL-3 protein bestemt. Skjønt at alvorlig tap av protein opptrådte av og til under dialyse, var total gjenvinning generelt 0,1-1 mg av "renset" IL-3-protein. Det eneste unntaket var de muterte 811 og 933, som ikke ga noe fusjonsproteinproduksjon i noen av E. coli-produksjonsvektorene. Northern analyse indikerte en sterk reduksjon av IL-3-spesifikke RNA i bakterien, mens ingen betydelig forskjell i plasmid DNA-innholdet

ble observert. Dette resultatet antyder at mRNA-stabilitet sannsynligvis er nedsatt gjennom fjernelsene som er introdusert i den eukaryote IL-3 cDNA-sekvensen.

Den eneste passende metoden for syntese av muteinene 811 og 933 er produksjon i Bacillus licheniformis. Skjønt mengden av protein produsert er meget lavt, sammenlignet med mengden protein som er laget i Bacillus-stammene som syntetiserer andre muteiner slik som 9329 og 1455, er nok laget for å rense delvis muteinene 811 og 933 i tilstrekkelige mengder for å utføre de biologiske målingene beskrevet her.

EKSEMPEL 4

Immunologisk karakterisering av IL-3-muteinene

Produksjon av polyklonale og monoklonale antisera er blitt beskrevet i WO 88/04691.

For immunologisk påvisning av IL-3-muteiner, ble de gel-fraksjonerte proteinene (se eksempel 3) overført på nitrocellulose (0,2 μm , Schleicher og Schuell BA83) ved bruk av det semi-tørre blottesystem (Novablot, Pharmacia/LKB) med et kontinuerlig buffersystem (39 mM glycin, 48 mM Tris, 0,037% SDS og 20% metanol) ved 1,2 mA/cm² i 90 min.. Nitrocellulosefilteret ble deretter luft-tørket, preinkubert med en 3% bovint serumalbumin (BSA, Sigma) løsning (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 350 mM NaCl; 0,1% PMSF og 0,1% natriumazid) og inkubert i 4-16 timer med polyklonale (10^{-3} fortynning) eller monoklonale (avhengig av det ønskede mål for eksperimentene) antistoffer som var rettet mot human IL-3 (MCA A1, A4, A5, A8, A18 i 10^{-4} fortynning) i RIA buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 0,1% SDS; 0,5% Na-deoxycholaat; 0,1 mM PMSF og 0,3% BSA). Immunologiske komplekser ble synliggjort ved bruk av biotinylerte anti-kanin eller muse Ig, streptavidin-biotinylert pepperrotperoksydase (Amersham International, Amersham, UK) og 4-klor-1-naftol (Gibco-BRL) ifølge protokollene gitt av produsenten. Alternativt ble antiseruminkubasjonene utført i Tris-bufret saltvann pluss 0,05% Tween 20. Alkalisk fosfatase-bundet anti-mus Ig-komplekser ble synliggjort ifølge standardprotokoller (Promega).

Resultatene, slik de angår interaksjonen mellom spesifikke monoklonale antistoffer med hIL-3 muteiner i western blotting eksperimenter er presentert i tabell 3.

Tabell 3
Evaluering av IL-3/MCA-data

MUTANT	4810	933	811	934	812	935	4813	ALLE
(AA)	20-30	29-37	31-49	47-54	54-61	60-70	66-80	ANDRE
MCA								
A1	++	--	--	++	++	++	++	++
A4	++	++	++	++	+	+	+	++
A5	++	++	--	--	+	++	++	++
A8	++	++	--	++	++	++	++	++
A18	++	--	--	++	++	++	++	++
2	++	--	--	++	++	++	++	++
3	++	++	--	--	+	++	++	++
6	++	++	--	+	++	++	++	++
10	++	++	--	+	++	++	++	++
12	++	--	--	++	++	++	++	++
13	+	--	--	++	++	+	+	++
14	++	++	--	--	+	++	++	++
15	++	--	--	++	++	++	++	++
26	++	++	--	+	++	++	++	++
27	++	++	++	++	+	+	+	++
32	++	--	--	++	++	++	++	++
33	++	--	--	++	++	++	++	++
		36D->R		43ED->KR		46D->R		
		1480		1481		1482		
A1		++		++		++		
A4		++		++		++		
A5		++		++		--		
A8		++		--		+		
A18		+		++		++		

A : ascites monoklonaler.

++ : full respons på western blot.

+

Fra analyse av resultatene presentert i tabell 3 er det klart at hoveddelen av de monoklonale antistoffene laget mot det gel-rensede denaturerte fusjonsproteinet, er rettet mot epitoper lokalisert mellom restene 30 og 50 i det modne IL-3-polypeptidet. Disse epitopene reflekterer for det meste lineære polypeptidkjeder, bare ett eksempel (13) av en diskontinuerlig epitop er blitt identifisert. Den største gruppen er i stand til å identifisere 933-mutanten, men unngår å reagere med 811-mutanten. Således må epitopen sitte mellom restene 37 og 50. Denne regionen viser seg å være sterkt hydrofil med en postulert β -sving og α -heliks (DNASIS database) og ble antatt å være en antigen determinant ved bruk av Hopp og Wood algoritme. Den andre gruppe antistoffer er karakterisert ved fraværet av reaksjon med mutant 933 (som mangler 9 aminosyrer). Denne hydrofobe prolinrike, kveilede region er ikke antatt å være et hovedantigenet sete.

En bedre lokalisering av disse epitopene kommer fra reaksjon av ascitesmonoklonaler med de følgende erstatningsmutanter: Asp³⁶ -> Arg, Glu⁴³Asp -> Lys⁴³Arg og Asp⁴⁶ -> Arg.

Videre karakterisering av ascitesmonoklonaler ved "dobbel sandwich" ELISA viste mangel på interferens mellom A1 og A5 eller A8, og mellom A5 og A18. Konkurrans-ELISA viste kryss-konkurranse mellom A1 og A18, mellom A5 og A8, og mellom A8 og A18. Ingen kryss-konkurranse ble observert med A4. Disse resultatene er i tråd med immunoblottingseksperimentene. Videre ble ascites antistoffene funnet å reagere med hIL-3-preparater fra pattedyr, bakterie og gjærkulturer, uavhengig av glykosyleringstilstand.

Fra den kombinerte informasjon fra disse immunologiske undersøkelser kan epitoper bli lokalisert som følger:

- A1 og A18 er rettet mot en epitop lokalisert mellom aminosyrene 29 og 37. Videre fra 36 D -> R mutant kan det bli konkludert at A18 epitopen er lokalisert noe mer mot C-enden enn A1-epitopen.
- A5 er rettet mot en epitop lokalisert mellom aminosyrene 45 og 54.
- A8 er rettet mot en epitop lokalisert mellom aminosyrene 36 og 47.

EKSEMPEL 5

Biologisk karakterisering av IL-3-muteinene

AML DNA-syntese ble testet på human AML193-celler. Human AML193 celler (ATCC: CRL-9589) ble holdt i serumfritt medium (SFM), [Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Gibco BRL) inneholdende 0,1% BSA (Behringwerke AG, Marburg), 10 µg/ml av insulin (Organon) og transferrin, 0,1 mM β-merkaptetanol] og 10 til 20 enheter humant IL-3. Fortynninger av (mutert) IL-3 preparater ble laget (50 µl) i runde 96-brønners plater i SFM. Vaskede celler ($1-2 \times 10^4$ i 50 µl SFM) ble tilsatt og dyrket i 6 dager. ^3H -thymidin (0,1 µCi, 2 µCi/mmol) ble tilsatt i 20 µl SFM og cellene ble dyrket 16 timer senere. En enhet på IL-3 aktivitet ble definert som mengden som var krevet for å gi 50% maksimal DNA-syntese i denne metoden. For referanse IL-3-preparatet varierte den spesifikke aktiviteten mellom 2×10^6 til 2×10^7 enheter pr. mg protein. Generelt, var den biologiske aktiviteten til muteinene sammenlignet med dette referansepreparatet.

Figur 4 viser et eksempel på AML celledelingsmetoden der mutein 812 blir sammenlignet med referanse IL-3 produsert i Bacillus. Figuren viser at mutein 812 har en aktivitet som er redusert med omkring 4 ordener i størrelse med hensyn til ikke-modifisert IL-3. Imidlertid er muteinet fremdeles i stand til å stimulere AML-celler til maksimal aktivitet, bare at mer protein er nødvendig.

En IL-3-reseptorbindingsmetode ble utført med rensset rekombinant hIL-3 (se EP-A-0275598 og EPA 90200624.6). IL-3 ble radioaktivt merket med Bolton-Hunter reagens (som beskrevet av Budel et al. Blood, 74 (1989) 565-571). Den spesifikke aktiviteten ble vurdert å være 80.000 cpm/ng IL-3. Som mål, ble enten donor-leukocytter, pasient AML-celler, eller MV4-11 (ATC: CRL-9591) celler benyttet. Cellene ble vasket i Hanks balanserte saltløsning og suspendert i alfa-MEM pluss 1% BSA. Vanligvis ble $3-10 \times 10^6$ celler inkubert med 200-300 pM radiomerket IL-3 og forskjellige konsentrasjoner av ikkemerket mutert protein i et totalt volum på 200 µl i 1 time ved 37°C. Celle-bundet merket IL-3 ble sentrifugert i 10 min. ved 1000xg ved 4°C gjennom 0,5 ml pute av bovin

kalveserum i et Eppendorfrør (Budell et al., 1989). Rørene ble frosset i flytende nitrogen og tuppene kuttet av for telling i en Packard gammateller. Konkurransbinding ble bestemt relativt til referansepreparatet. Figur 5 viser et eksempel på et IL-3-reseptorbindingseksperiment. Radioaktiv merket IL-3 binding til pasient AML-blaste blir konkurrert med ikke-merket IL-3 protein (referansepreparat). P.g.a. det lave antallet reseptorer (mindre enn 200) på målcellene, varierte resultatene fra konkurransen ved én størrelsesorden.

Resultatene fra de ovenfornevnte målingene vedrørende de spesifiserte delesjons- og substitusjonsmutantene er presentert i tabell 4. Del av resultatene er også presentert grafisk i figur 6.

Det sees at IL-3-fusjonsproteinene som stammer fra både pGB/IL-336 og pGB/IL-339 produksjonsplasmider var identisk i biologisk aktivitet og var ikke signifikant forskjellige fra B. licheniformis referansepreparat som stammer fra produksjon av full-lengde IL-3 cDNA i pGB/IL-322 (se EPA 89201967.0). Tilsynelatende er ikke noe negativ effekt utøvet vis-à-vis den biologiske aktiviteten av det heterologe lederpeptid i E. coli-fusjonsproteinene. De fleste IL-3-delesjonsmutantene fikk i vesentlig grad redusert sin biologiske aktivitet. Fjernelsene mellom aminosyrene 50 og 105, resulterte i mer enn 10.000 ganger reduksjon i spesifikk aktivitet. Imidlertid ble i alle tilfeller restbiologisk-aktivitet oppdaget, hvilket var en indikasjon på følsomheten til bio-måle-metoden og fraværet av toksiske komponenter i proteinpreparatene. Fullstendig gjenvinning av biologisk aktivitet ble observert for delesjonsmutantene 932 (1-14) og 939 (120-130) og den korresponderende dobbelmutanten 9329 så vel som for den C-terminale mutanten 1455. De fjernede N- og C-terminale sekvensene er tilsynelatende ikke innblandet i binding til reseptoren eller riktig folding av molekylet. I kontrast, resulterte enkle substitusjoner av cystein-restene (mutanter 904 og 905) i en 5000 ganger reduksjon i biologisk aktivitet. Lignende effekter ble sett med en dobbel cysteinmutant (9045), hvilket indikerte at S-S-broen spiller en viktig stabiliserende rolle i det naturlige IL-3 molekylet.

Muteinene produsert i E. coli beskrevet i avsnittet over er alle fusjonsproteiner. For å gi holdepunkter for at de ekstra N-terminale aminosyrene ikke er nødvendig som kompensasjon for tapet

av de fjernede IL-3 spesifikke aminosyrene, ble konstruksjon pGB/IL-322/9329 laget og uttrykt i B. licheniformis. Denne konstruksjon gir opphav til en 1-14/ 120-130 IL-3 mutein uten noen ekstra aminosyrer ved N-terminalen. Aktiviteten i dette mutein er sammenlignbar med villtypemolekylet hvilket beviser at bare de gjenværende 108 aminosyrer er ansvarlige for IL-3-aktiviteten.

Reseptorbinding til mesteparten av de muterte IL-3 proteinene ble bestemt. Bindingseksperimentene tillater ikke en detaljert sammenligning av reseptorbindingsaktiviteten p.g.a. det lave antall reseptorer på målcellene. Imidlertid det er generelt en god korrelasjon mellom biologisk aktivitet og reseptorbinding (tabell 4). For de fleste muterte IL-3 proteiner, er forholdet mellom relativ binding og biologisk aktivitet omtrent 1. Muteinene 1483, 1488, 904 og 9045 viser betraktelig høyere forhold (tabell 4 og figur 6), hvilket indikerer potensiell antagonistisk aktivitet. Dette betyr at disse molekylerne kan bli ansett som delvise antagonister av IL-3. Med videre undersøkelser kan muteinene bli funnet å ha den samme bindingskapasiteten som naturlig IL-3, men at de har en 10^4 -ganger lavere aktivitet. Disse molekylerne ville være sanne antagonister av IL-3. Fremgangsmåten beskrevet i denne oppfinnelse tilveiebringer mulighetene og fremgangsmåtene for å oppnå slike molekyler.

Tabell 4
Biologiske aktiviteter til IL-3-mutanter

MUTERT KODE	AMINOSYRE- DELESJON ELLER SUBSTITUSJON ¹	RELATIV SPESIFIKK BIOLOGISK AKTIVITET	RELATIV ANTAGONISTISK POTENSIAL ³
Ref.		1.0	
pGB/IL-339		3.7×10^{-1}	
pGB/IL-336		7.9×10^{-1}	1.1 (0.2-3.3)
932	1-14	7.1×10^{-1}	2.8 (0.6-4.9)
810	20-30	2.1×10^{-3}	2.4
934	47-54	7.3×10^{-5}	N.C.
812	54-61	5.3×10^{-5}	1.2 (0.9-1.4)
935	60-70	1.2×10^{-5}	N.C.
813	66-80	2.4×10^{-5}	N.C.
936	76-83	6.4×10^{-6}	N.C.
820	85-90	1.1×10^{-5}	N.C.
937	89-95	1.0×10^{-5}	N.C.
821	94-102	1.8×10^{-5}	N.C.
938	103-111	6.6×10^{-5}	N.C.
822	107-119	2.1×10^{-4}	1.9 (0.6-3.9)
939	120-130	2.0	1.8 (0.3-2.8)
9329	1-14/120-130	4.0×10^{-1}	2.0 (1.8-2.1)
904	16C-->A	2.4×10^{-4}	100 (33-210)
905	84C-->A	1.9×10^{-4}	11 (4.8-38)
9045	16/84C-->A	3.1×10^{-4}	88 (13-170)
1480*	36D-->R	3.1×10^{-3}	12
1481	43ED-->KR	$<1.5 \times 10^{-4}$	N.C.
1482*	46D-->R	7.5×10^{-3}	0.6
1483	50E-->K	2.7×10^{-3}	37 (4-67)
1484	54RR-->ED	8.0×10^{-5}	3.5 (2.3-4.7)
1485*	59E-->K	1.1×10^{-2}	3
1486	63RA-->PG	9.8×10^{-5}	14 (3.5-27)
1487A*	75E-->G	1.5×10^{-2}	3
1487B*	75E-->R	8.6×10^{-3}	3
1488	79K-->E	1.9×10^{-3}	65 (54-77)
1489	94R-->P	1.7×10^{-3}	N.C.
1490*	98HIKD-->EIDQ	2.2×10^{-3}	5
1491*	106E-->K	3.2×10^{-4}	6
1492	108RRK-->EDE	3.1×10^{-5}	2 (1.2-3)
1493	113FY-->AT	$<1.2 \times 10^{-5}$	N.C.
X#	1-14/120-133	2.3×10^{-1}	8.9 (3.6-14)
Z#	1-14/116-133	1.1×10^{-1}	1.6 (1-1.9)
933#	29-37	5.7×10^{-3}	1.1 (0.2-2.9)
811#	31-49	4.8×10^{-3}	1.6 (0.5-3.2)

- 1) Fjernelse mellom aminosyretallene til intakt human IL-3 er indikert. Erstatninger av aminosyrer er indikert i enkel bokstavkode.
 - 2) Midlere spesifikk biologisk aktivitet er uttrykt i forhold til referanse-IL-3-preparatene.
 - 3) Antagonistisk potensial er vist som relativ reseptor-bindingsaktivitet delt på relativ biologisk aktivitet. Spredningen er vist mellom parentesene.
 - * Inklusjonslegemer ble bunnfelt fra sukroseløsninger og løst opp i urea. Muteiner ble fortynnet i medium og testet for biologisk aktivitet. Reseptorbindingseksperimenter ble utført én gang.
 - # Muterte proteiner ble produsert i Bacillus og mangler en leder-polypeptidsekvens.
 - \$ Muteinproteinkonsentrasjon var for lav for densitometrisk måling og ble vurdert fra geler og western blot.
- N.C. Ingen konkurranse ble observert for det spesielle mutein-preparatet.

Alle publikasjoner (inklusive patenter og patentsøknader) nevnt i denne spesifikasjonen er en indikasjon på nivået av dyktighet for de erfarne i feltet og relevante for denne oppfinnelse. Alle publikasjoner er herved inkorporert ved referanse i den samme grad som om hver individuell publikasjon ble spesifikt og individuelt indikert å være inntatt ved referanse.

P a t e n t k r a v

1. DNA-fragment som koder for det humane IL-3 protein med den følgende sekvens:

Ala Pro Met Thr Gln⁵ Thr Thr Pro Leu Lys¹⁰
 Thr Ser Trp Val Asn¹⁵ Cys Ser Asn Met Ile²⁰
 Asp Glu Ile Ile Thr²⁵ His Leu Lys Gln Pro³⁰
 Pro Leu Pro Leu Leu³⁵ Asp Phe Asn Asn Leu⁴⁰
 Asn Gly Glu Asp Gln⁴⁵ Asp Ile Leu Met Glu⁵⁰
 Asn Asn Leu Arg Arg⁵⁵ Pro Asn Leu Gln Ala⁶⁰
 Phe Asn Arg Ala Val⁶⁵ Lys Ser Leu Gln Asn⁷⁰
 Ala Ser Ala Ile Glu⁷⁵ Ser Ile Leu Lys Asn⁸⁰
 Leu Leu Pro Cys Leu⁸⁵ Pro Leu Ala Thr Ala⁹⁰
 Ala Pro Thr Arg His⁹⁵ Pro Ile His Ile Lys¹⁰⁰
 Asp Gly Asp Trp Asn¹⁰⁵ Glu Phe Arg Arg Lys¹¹⁰
 Leu Thr Phe Tyr Leu¹¹⁵ Lys Thr Leu Glu Asn¹²⁰
 Ala Gln Ala Gln Gln¹²⁵ Thr Thr Leu Ser Leu¹³⁰
 Ala Ile Phe

k a r a k t e r i s e r t v e d at sekvensen som koder for aminosyrene 116-133, 120-130, 130-133 eller 120-133, eventuelt også aminosyrene 1-14 er deletert.

2. DNA-fragment som koder for det humane IL-3 protein med den følgende sekvens:

Ala Pro Met Thr Gln⁵ Thr Thr Pro Leu Lys¹⁰
 Thr Ser Trp Val Asn¹⁵ Cys Ser Asn Met Ile²⁰
 Asp Glu Ile Ile Thr²⁵ His Leu Lys Gln Pro³⁰
 Pro Leu Pro Leu Leu³⁵ Asp Phe Asn Asn Leu⁴⁰
 Asn Gly Glu Asp Gln⁴⁵ Asp Ile Leu Met Glu⁵⁰
 Asn Asn Leu Arg Arg⁵⁵ Pro Asn Leu Glu Ala⁶⁰
 Phe Asn Arg Ala Val⁶⁵ Lys Ser Leu Gln Asn⁷⁰
 Ala Ser Ala Ile Glu⁷⁵ Ser Ile Leu Lys Asn⁸⁰
 Leu Leu Pro Cys Leu⁸⁵ Pro Leu Ala Thr Ala⁹⁰
 Ala Pro Thr Arg His⁹⁵ Pro Ile His Ile Lys¹⁰⁰
 Asp Gly Asp Trp Asn¹⁰⁵ Glu Phe Arg Arg Lys¹¹⁰
 Leu Thr Phe Tyr Leu¹¹⁵ Lys Thr Leu Glu Asn¹²⁰
 Ala Gln Ala Gln Gln¹²⁵ Thr Thr Leu Ser Leu¹³⁰
 Ala Ile Phe

k a r a k t e r i s e r t v e d at sekvensen som koder for aminosyrene 1-14 er deletert.

3. DNA-fragment som koder for det humane IL-3 protein med den følgende sekvens:

```

Ala Pro Met Thr Gln5 Thr Thr Pro Leu Lys10
Thr Ser Trp Val Asn15 Cys Ser Asn Met Ile20
Asp Glu Ile Ile Thr25 His Leu Lys Gln Pro30
Pro Leu Pro Leu Leu35 Asp Phe Asn Asn Leu40
Asn Gly Glu Asp Gln45 Asp Ile Leu Met Glu50
Asn Asn Leu Arg Arg55 Pro Asn Leu Glu Ala60
Phe Asn Arg Ala Val65 Lys Ser Leu Gln Asn70
Ala Ser Ala Ile Glu75 Ser Ile Leu Lys Asn80
Leu Leu Pro Cys Leu85 Pro Leu Ala Thr Ala90
Ala Pro Thr Arg His95 Pro Ile His Ile Lys100
Asp Gly Asp Trp Asn105 Glu Phe Arg Arg Lys110
Leu Thr Phe Tyr Leu115 Lys Thr Leu Glu Asn120
Ala Gln Ala Gln Gln125 Thr Thr Leu Ser Leu130
Ala Ile Phe

```

k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter en intern delesjon i en region valgt fra gruppen bestående av aminosyrene fom. 20 tom. 30, fom. 47 tom. 54, fom. 54 tom. 61, fom. 60 tom 70, fom. 66 tom. 80, fom. 76 tom. 83, fom. 85 tom. 90, fom. 89 tom. 95, fom. 94 tom.102, fom. 103 tom. 111, fom. 107 tom. 119.

4. DNA-fragment, k a r a k t e r i s e r t v e d at det koder for et biologisk aktivt polypeptid analogt med human IL-3 med minst en av de følgende substitusjoner:

Asp36	- > Arg36
Glu43Asp44	- > Lys43Arg44
Arg54Arg55	- > Glu54Asp55
Asp46	- > Lys 46 eller Arg46
Glu50	- > Lys50 eller Arg50
Glu59	- > Lys59 eller Arg59
Arg63Ala64	- > Pro63Gly64
Glu75	- > Arg75 eller Gly75
Lys79	- > Glu79

Arg94	- >	Pro94
His98Lys100Asp101	- >	Glu98Asp100Gln101
Glu106	- >	Lys106
Arg108Arg109Lys110	- >	Glu108Asp109Glu110
Phe113Tyr114	- >	Ala113Thr114
Cys16	- >	Ala16
Cys84	- >	Ala84
Cys16Cys84	- >	Ala16Ala84.

5. Ekspresjonsvektor, k a r a k t e r i s e r t v e d at den inneholder en DNA-sekvens som koder for ethvert av polypeptidene ifølge krav 1-4 i kombinasjon med transkripsjons- og translasjonsreguleringssekvenser, samt en seleksjonsmarkør, som muliggjør ekspresjon av nevnte peptider i egnede vertsceller.

6. Ekspresjonsvektor ifølge krav 5, k a r a k t e r i s e r t v e d at transkripsjons- og translasjonsreguleringssekvensene muliggjør ekspresjonen i Escherichia coli, Bacillus, sopp, gjær eller andre høyere eukaryote cellerlinjer.

7. Vertscelle, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert med en ekspresjonsvektor ifølge krav 5 eller 6.

8. Fremgangsmåte for fremstilling av et terapeutisk aktivt polypeptid analogt med IL-3, k a r a k t e r i s e r t v e d

- innføring av DNA-sekvensen ifølge kravene 1-4 som koder for nevnte polypeptid i en ekspresjonsvektor, slik at den står under kontroll av egnede ekspresjonsreguleringssekvenser,
- innføring av nevnte ekspresjonsvektor i en egnet vertscelle,
- dyrking av vertscellene,
- utvinning av proteinet som vertscellene har produsert.

Figur 1

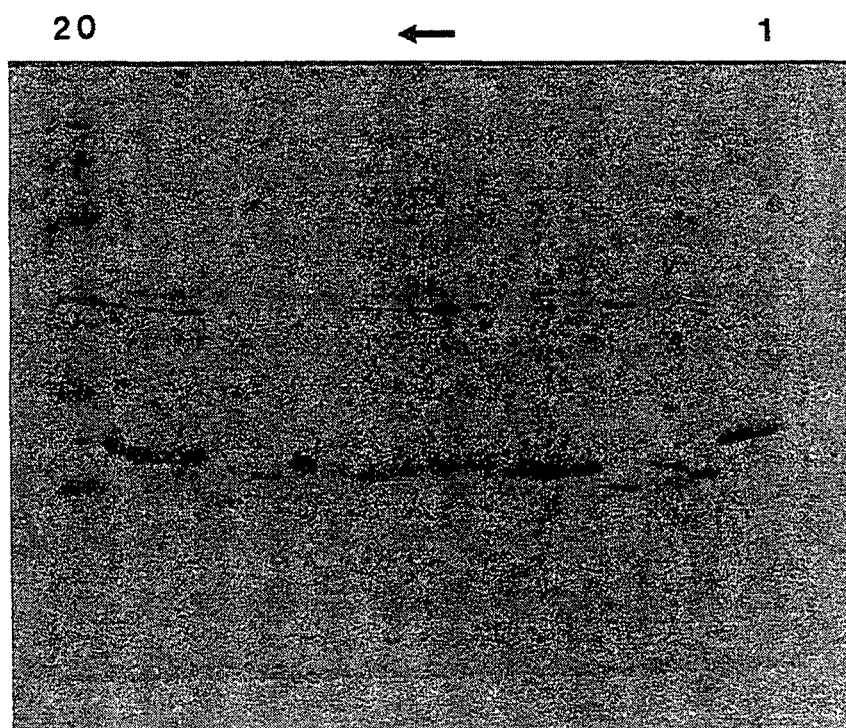
[illegible]

Figur 2

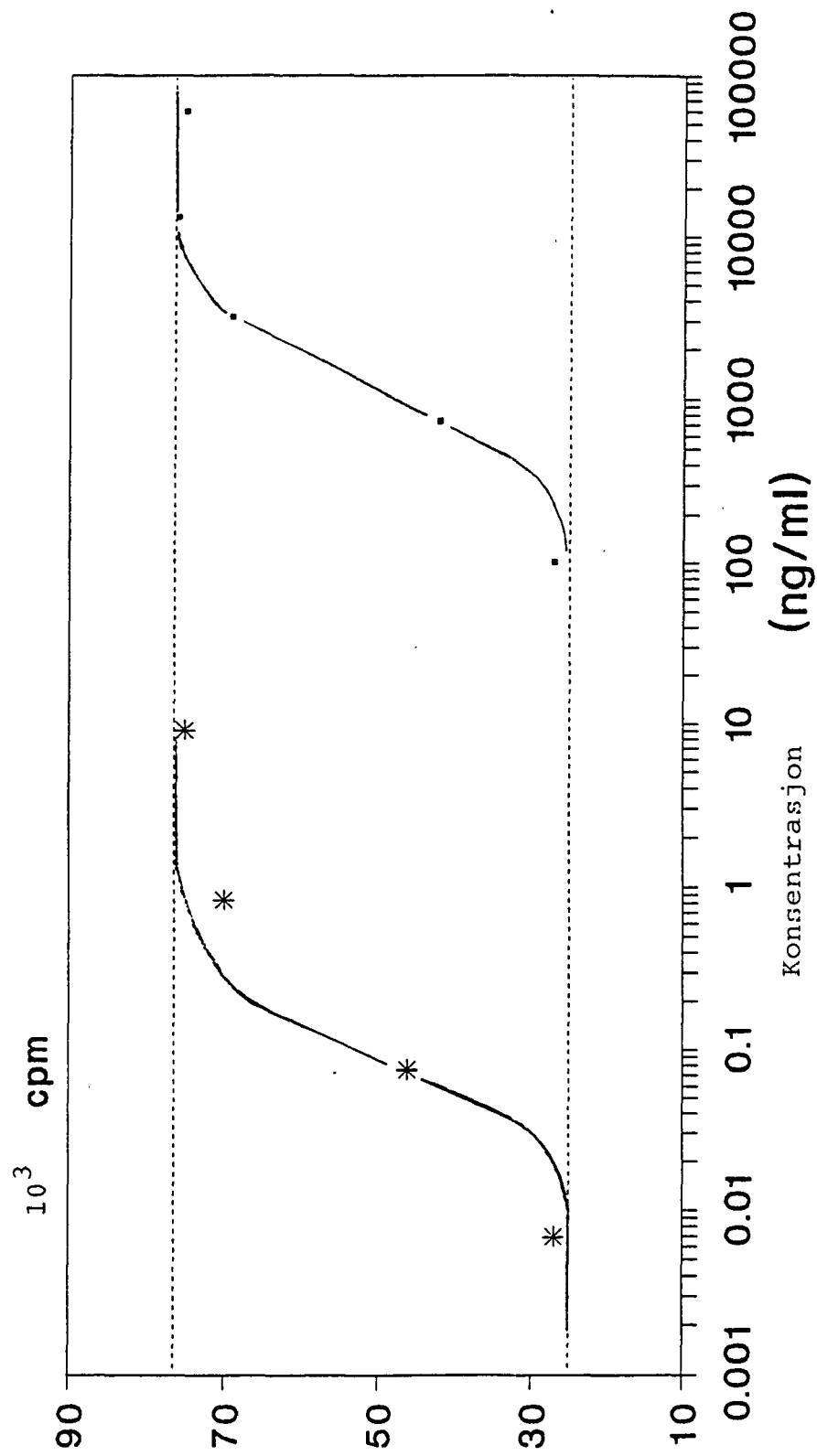
```
      5'
-15  met thr met ile thr asn ser arg gly ser ser ala ala ala ala Ala 1
   1  ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CGG GGA TCC TCT GCA GCA GCG GCG GCT 48
...  .....

      3'
130  Leu Ala Ile Phe ***
433  CTC GCG ATC TTT TGA CTC GAG TAG AAG AGA AGA GAA TC
```

Figure 3



AML FORMERINGSMÅLING

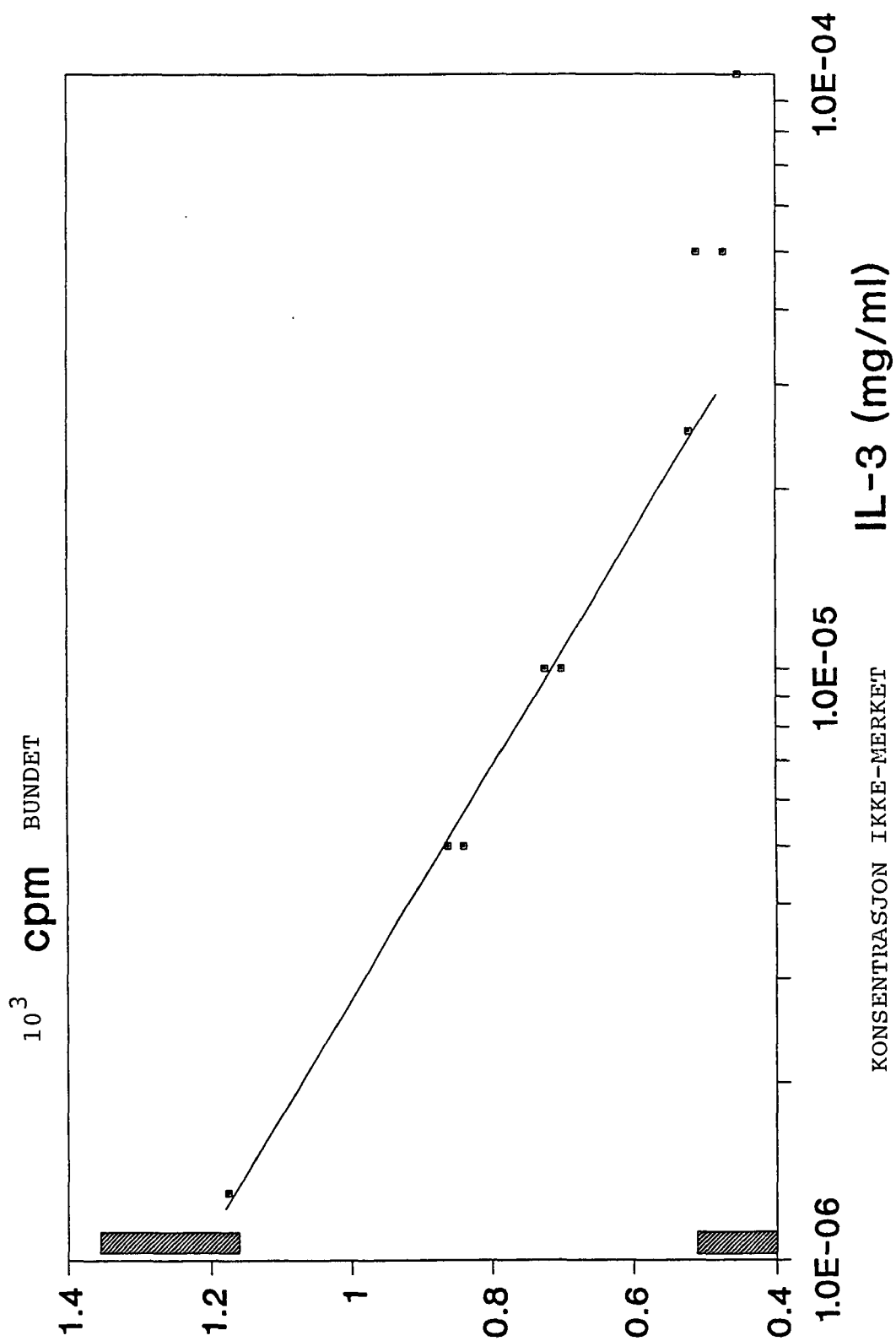


• 812 * Referanse

Figur 4

301481

IL-3 RESEPTORBINDINGSMÅLING



Figur 5

301481

AKTIVITETER AV IL-3 MUTANTER

