



**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT**

81118

C (12) Patentti- ja rekisterihallitus
100 10 11 11 11 10 00 1000

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12P 21/02, C 12N 15/26, C 07K 13/00

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	844678
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	28.11.84
(24) Alkupäivä - Löpdag	28.11.84
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	29.05.85
(44) Nähtäväksipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.05.90
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
28.11.83 JP 58-225079 P	

SUOMI-FINLAND

(FI)

**Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(71) Hakija - Sökande

1. Takeda Chemical Industries, Ltd., 27, Doshomachi 2-chome, Higashi-ku, Osaka, Japan, (JP)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Kato, Koichi, 2-49, Fushimidai 1-chome, Inagawa-cho, Kawabe-gun, Hyogo, Japan, (JP)
2. Yamada, Takao, 552, Hitotsuya-cho, Matsubara, Osaka, Japan, (JP)
3. Onda, Haruo, 21-6, Aza-junmatsu, Tada-in, Kawanishi, Hyogo, Japan, (JP)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Borenus & Co Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä olennaisesti puhtaan interleukiini-2 proteiinin valmistamiseksi
Förfarande för framställning av väsentligen rent interleukin-2 protein**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 92163 (C 12 P 21/00), EP A 91539 (C 12 N 15/00), EP A 94317 (C 12 P 21/00),
EP A 89692 (C 12 N 15/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksinnön kohteena on olennaisesti puhdas glykosyloimaton ihmisen interleukiini-2-proteiini, jonka spesifinen aktiivisuus on vähintään 10^4 U/mg, joka saadaan kasvattamalla transformanttia, joka sisältää ihmisen interleukiini-2:ta koodaavan DNA:n emäsjärjestyksen, ihmisen interleukiini-2:den tuottamiseksi ja sen kartuttamiseksi kasvatusliuokseen. Näin saatu ihmisen interleukiini-2:ta sisältävä neste puhdistetaan menetelmällä, joka koostuu hydrofobisesta pylväskromatografiasta.

Uppfinningen avser väsentligen rent icke-glykolyserat humant interleukin-2-protein med en specifik aktivitet om minst 10^4 U/mg, som erhålls genom att man odlar en transformant innehållande en DNA med en bassekvens, som kodar för humant interleukin-2 så, att det produceras och ackumuleras humant interleukin-2 i kulturlösningen. Den så erhållna humant interleukin-2-innehållande lösningen renas med en metod som omfattar hydrofob kolumnkromatografi.

```

      1
X-Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln

      20
Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn

Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met

      40
Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu

      60
Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro

Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe

      80
His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val

      100
Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met

Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe

      120
Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser

      133
Thr Leu Thr

```

Menetelmä olennaisesti puhtaan interleukiini-2 proteiinin valmistamiseksi

Förfarande för framställning av väsentligen rent interleukin-2 protein

Tämä keksintö liittyy ihmisen interleukiini-2 proteiinin tuotantomenetelmään geeninsiirtotekniikan avulla.

Interleukiini-2 (jota kutsutaan myös T-solukasvutekijäksi (TCGF); lyhennetään tämän jälkeen IL-2) on T-solujen lektiini- tai alloantigeenistimulaation jälkeen tuottama lymfokiini (Science, 193, 1007 (1976); Immunological Reviews, 51, 257 (1980)). IL-2 tekee mahdolliseksi T-solujen pitkäaikaisen kasvatuksen sallimalla niiden kasvaa in vitro samalla pitäen yllä niiden toimintoja. IL-2:den on lisäksi ilmoitettu edistävän kateenkorvan solujen mitogeenireaktiota (kostimulaattori), säilyttävän pernasolujen vasta-ainetuoton T-soluista riippuvaisia antigeenejä vastaan nude-hiirillä (nude mouse, kateenkorvaton hiiri) (T-solujen korvaava tekijä) tai edistävän tappajasolujen (killer cells) erilaistumista ja lisääntymistä (killer helper-tekijä) (The Journal of Immunology, 123, 2928 (1979); Immunological Reviews, 51, 257 (1980)).

IL-2:ta hyväksi käyttäen on tähän mennessä saatu useita tappaja-T-soluklooneja, T-auttajasoluklooneja (helper T cell clones) ja lisäksi luonnollisia tappajasoluklooneja (esim. Nature, 268, 154 (1977); The Journal of Immunology, 130, 981 (1983)). Tällaisen suoran käytön lisäksi T-solun tai luonnollisen tappajasolun kloonauksessa voidaan IL-2:ta käyttää sellaisten tappajasolujen, jotka ovat spesifisiä tietyille antigeeneille, esim. tuumoriantigeenin tunnistavien ja kasvaimen tuhoavien tappaja-T-solujen selektiiviseen kasvattamiseen in vitro. Injektoimalla tällä tavoin kasvatettuja tuumorispesifisiä tappaja-T-soluja eläimeen on mahdollista estää ja ehkäistä kasvaimen kasvu (The Journal of Immunology, 125, 1904 (1980)). Tiedetään myös, että IL-2 indusoi IFN- γ :n tuotantoa (The Journal of Immunology, 130, 1784 (1983)) ja että IL-2 aktivoi luonnollisia tappajasoluja (The Journal of Immunology, 130,

1970 (1983)).

Yllämainitut kokemuseräiset seikat tuovat mieleen ajatuksen, jonka mukaan IL-2 voisi mahdollisesti olla käyttökelpoinen antituumorisena aineena. IL-2:den tiedetään säilyttävän auttaja-T-solutoiminnon nudehiirissä, joilta puuttuu kateenkorvan toiminta (European Journal of Immunology, 10, 719 (1980)) tai säilyttävän tappaja-T-solujen induktion homologisia soluja vastaan (Nature, 284, (1980)), ja siksi IL-2:den voidaan odottaa olevan käyttökelpoinen hoidettaessa sairauksia, joiden epäillään olevan immunologisperäisiä.

Kuitenkin laajan mittakaavan IL-2:den tuotanto on tähän saakka ollut vaikeaa, niin että sen kliiniset sovellutukset ovat olleet toistaiseksi mahdottomia. Tämän johdosta on odotettu tekniikkaa, joka tekee mahdolliseksi tuottaa suuria määriä hyvin puhdistettua IL-2:ta helposti ja yksinkertaisella tavalla alhaisin kustannuksin.

Taniguchi ym., jotka kloonasivat ihmisen IL-2-geenin käyttämällä lähtömateriaalina ihmisen leukeemisesta T-solulinjasta Jurkatista eristettyä IL-2 mRNA:ta, ilmoittivat siitä johdetun ihmisen IL-2-proteiinin aminohappojärjestyksen ja että geeni ilmentyi COS-7 soluissa (Nature, 302, 305 (1983)). Myöhemmin Devos ym. ilmoittivat, että ihmisen pernan soluista peräisin oleva IL-2-geeni oli kloonattu ja että se ilmentyi Escherichia colissa (Nucleic Acids Research, 11, 4307 (1983)). Kuitenkin tähän asti IL-2:den kaltaisen aineen olemassaolo on arvioitu ainoastaan todetun TCGF-aktiivisuuden perusteella. Raporttia, joka ilmoittaisi että transformantin, jossa on ihmisen IL-2:ta koodaava DNA, tuottamaa ihmisen IL-2-proteiinia olisi todella eristetty puhdistetussa muodossa ei ole.

Tämän keksinnön keksijät johtivat intensiivisiä tutkimuksia joiden päämääränä oli kehittää tekniikka, jonka avulla haluttu IL-2-proteiini voidaan saada kloonamalla ihmisen IL-2-geeni käyttämällä hyväksi geeninsiirtotekniikkaa, siirtämällä aikaansaatu yhdistelmä-DNA-molekyyli isäntään ja ilmentämällä

ihmisen IL-2-geeni mainitussa isännässä, ja tuloksena voidaan esittää menetelmä olennaisesti puhtaan, glykosyloimattoman IL-2-proteiinin tuottamiseksi.

Keksintö määritellään oheisissa patenttivaatimuksissa ja se antaa käyttöön menetelmän olennaisesti puhtaan glykosyloimattoman ihmisen IL-2-proteiinin tuottamiseksi, jonka proteiinin spesifinen aktiivisuus on vähintään 10^4 U/mg, jonka puhtaus on vähintään 99 % ja joka on olennaisesti endotoksiinia ja pyrogeenia sisältämätön. Menetelmässä kasvatetaan Escherichia coli transformanttia, jossa on ihmisen IL-2:ta koodaavan emäsjärjestyksen omaava DNA, ja proteiini puhdistetaan käänteisfaasi pylvästä käyttävän HPL-kromatografian avulla kasvatusalustasta.

Ihmisen IL-2:ta koodaava DNA, jota käytetään tämän keksinnön käytännön suorituksessa on esim. DNA (I), jonka emäsjärjestystä määräävät kodonit 1-133 kuvassa 2. Tällä DNA (I):llä voi vaihtoehtoisesti olla 5'-päässään joko ATG tai signaalisekvenssi, jota kuvaavat kodonit S1-S20 kuvassa 2 ja 3'-päässään TAA, TGA, tai TAG, mieluiten TGA.

DNA (I) on liitetty mieluummin promoottorin alapuolella olevalle alueelle esim. tryptofaanipromoottorin (trp), rec A- promoottorin tai λ_{PL} -promoottorin alle, sopivia ovat trp- tai λ_{PL} -promoottori. Keksinnön mukaisesti ihmisen IL-2:ta koodaava mRNA eristetään kasvatetuista ihmisen periferallisista leukosyyteistä, joita on stimuloitu esim. konkavaliini-A:lla. Sitteen syntetisoidaan yksijuosteinen cDNA käyttämällä käänteiskopioijaentsyymiä ja syntetisoidaan edelleen kaksijuosteinen DNA. DNA liitetään plasmidiin, yhdistelmäplasmidia käytetään esim. Escherichia coli- tai Bacillus subtilis-kannan transformoimiseen ja cDNA:ta sisältävä plasmidi kloonataan. Tällä tavoin voidaan tuottaa ihmisen IL-2:ta koodaavaa kaksijuosteista DNA:ta.

Yksityiskohtaisemmin ilmoitettuna tämän keksinnön käytännön suorituksessa käytettävä ihmisen IL-2:ta koodaava mRNA voidaan

saada Hinuman ym. käyttämällä menetelmällä (Biochemical and Biophysical Research Communications, 109, 363 (1982)). Tällä tavalla saatua ihmisen IL-2 mRNA:ta templaattina käyttäen syntetisoidaan cDNA sinänsä tunnetulla menetelmällä käyttäen käänteiskopioijaentsyymejä ja cDNA muutetaan kaksijuosteiseksi DNA:ksi (Maniatis, T. et al. Cell, 8, 163 (1976); Land, H. et al., Nucleic Acids Research, 9 2251 (1981)). Tämä DNA liitetään esimerkiksi plasmidiin pBR322 PstI-restiktioendonukleaaasin katkaisukohtaan esim. dG-dC homopolymeeriligaatiomenetelmällä (Nelson, T. S., Methods in Enzymology, 68, 41 (1979)). Lisäksi oligonukleotidi, jolla on osaa ihmisen IL-2:den aminohappojärjestystä vastaava emäsjärjestys, syntetisoidaan esim. kemiallisesti ja leimataan sitten P:lla. Käyttämällä tätä koettimena haluttu kloonin valikoidaan tetrasykliini- tai ampicilliiniresistenttien transformanttien joukosta sinänsä tunnetulla pesäkehybridisaatiomenetelmällä (Grunstein, M. and Hogness, D. S., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961 (1975); Alwine, J. C. et al., Methods in Enzymology, 68, 220 (1979)). Ihmisen IL-2-geenin läsnäolo varmistetaan määrittämällä em. hybridisaatiomenetelmässä positiiviseksi osoittautuneesta kloonista saadun DNA:n emäsjärjestys Maxam-Gilbert menetelmällä (Maxam, A. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 560 (1977)) tai menetelmällä, jossa dinukleotidiketju päätetään synteettisesti käyttämällä faagia M13 (Messing, J. et al., Nucleic Acids Research, 9, 309 (1981)). Sitten koko ihmisen IL-2-geeni tai osa siitä pilkotaan irti saadusta kloonista ja liitetään plasmidiin sopivan promoottorin ja SD-emäsjärjestyksen (Shine-Dalgarno) alle myöhemmin tapahtuvaa sopivaan isäntään siirtämistä varten.

Mm. trp-promoottorin käyttäminen promoottorina on edullista. Isäntänä on edullista käyttää mm. Escherichia coli-kantaa (esim. kanta 294, kanta DHI, kanta N4830).

Kannat Escherichia coli 294 (Beckman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73 4174 (1976)), E. coli DHI (Selson, M. E. et al., Nature, 217, 1110 (1968)) ja E. coli N4830 (Cell, 25, 713

(1981)) ovat tunnettuja kantoja.

Tällaisten isäntien transformointi DNA:lla voidaan suorittaa tunnetulla menetelmällä (Cohen, S.N. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)). Tällä tavoin saatua isäntää kasvatetaan sinänsä tunnetussa kasvatusliuoksessa kuten glukosia ja kasaminohappoa sisältävässä M9-kasvatusliuoksessa (Miller, J. Experiments in Molecular Genetics, sivut 431-433 (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1972)). Tapauksissa, joissa käytetään trp-promoottoria voidaan lisätä vaikuttavaa ainetta kuten 3- β -indolyyliakryylihappoa lisäämään mainitun promoottorin tehokkuutta. Kasvatus suoritetaan yleensä 15-43 °C:ssa 3-24 tuntia ilmastaen ja/tai sekoittaen tarpeen mukaan.

Tapauksessa, jossa käytetään λ PL-promoottoria kasvatus suoritetaan mieluummin suhteellisen alhaisessa noin 30-36 °C:n lämpötilassa transformanttien kasvattamiseksi ja sitten noin 37-42 °C:ssa, jotta transformanttien repressorin inaktivoituisi ja ihmisen IL-2:ta koodaava DNA ilmentyisi tehokkaasti.

Tällä tavoin tehdyn ihmisen IL-2:den pitoisuus voidaan määrittää käyttämällä IL-2:sta riippuvaista solulinjaa. Koska ihmisen IL-2:den tiedetään edistävän rotan, hiiren tai jonkin muun eläimen IL-2:sta riippuvaisien solujen kuten myös ihmisen IL-2:sta riippuvaisien solujen kasvua (Immunological Reviews, 51, 257 (1980)), ei ainoastaan IL-2:sta riippuvaisia ihmisen solulinjoja, mutta myös rotan tai hiiren IL-2:sta riippuvaisia solulinjoja voidaan myös käyttää (Journal of Immunology, 130, 981 and 988 (1983)).

Erityisesti hiiren IL-2:sta riippuvaisia solulinjoja voidaan pitää yllä pysyvästi jatkoviljelemällä niitä pitkän aikaa niin, että niiden käyttäminen voi antaa hyvin toistettavia määritystuloksia.

Uutettaessa IL-2:ta tämän keksinnön mukaisesti kasvatetuista

soluista solut kerätään kasvatuksen jälkeen tunnetulla menetelmällä, suspendoidaan proteiinia denaturoivan aineen liuokseen kuten guadiinin mineraalihapposuolaan (esim. vetykloridi, nitraatti, sulfaatti), suspensiota sekoitetaan kylmässä ja sitten se sentrifugoidaan, jolloin saadaan IL-2:ta sisältävä supernatantti, tai kerätyt solut suspendoidaan puskuriin ja rikotaan sonikoimalla, lysotsyymikäsittelyllä ja/tai jäähdyttämällä ja sulattamalla, mitä seuraa sentrifugointi, josta saadaan IL-2:ta sisältävä supernatantti. Myös mitä hyvänsä muuta sopivaa menetelmää voidaan käyttää.

IL-2:den eristäminen em. supernatantista ja sen myöhempi puhdistus voidaan suorittaa yhdistämällä sopivasti sinänsä tunnettuja eristys- ja puhdistusmenetelmiä. Tällasiin tunnettuihin eristys- ja puhdistusmenetelmiin kuuluvat mm. menetelmät, joissa käytetään hyväksi liukoisuuseroja kuten poistosuolausmenetelmä ja liuotinsaostusmenetelmä, menetelmät, joissa käytetään hyväksi pääasiallisesti molekyyllipainoeroja kuten dialyysi, ultrasuodatus, geelisuodatus ja SDS-polyakrylamidigeelielektroforeesi, menetelmät, joissa käytetään hyväksi varauseroja kuten ioninvaihtokromatografia, menetelmät, joissa käytetään hyväksi spesifisiä affiniteetteja kuten affiniteettikromatografia, menetelmät, joissa käytetään hyväksi hydrofobisuuseroja kuten käänteisfaasi, HPL-kromatografia (high performance liquid chromatography) ja menetelmät, joissa käytetään hyväksi isoelektrisen pisteen eroja kuten isoelektrinen fokuointi. Koska ihmisen IL-2-proteiini on erittäin hydrofobinen, hydrofobinen pylväskromatografia, erityisesti HPL-kromatografia käänteisfaasipylvästä käyttäen on erittäin tehokas mainitun proteiinin puhdistuksessa.

Tällä tavalla esim. ihmisen IL-2:ta koodaavaa geeniä kantavaa Escherichia coli-kantaa kasvattamalla saadut solut suspendoidaan liuokseen, mieluummin proteiinia denaturoivaa ainetta sisältävään puskuriin kuten guaniinivetykloridiin (pitoisuutena 2-8 M, mieluummin 6-8 M) ja suspensiota sekoitetaan, mieluummin 0-5 °C:ssa 0,5-3 tuntia ja sitten sentrifugoidaan.

Tällä tavoin kerätty supernatantti dialysoidaan joko sellaisenaan tai käyttämällä ultrasuodatuslaitetta tai vastaavaa suoritettun konsentroinnin jälkeen. Syntynyt sakka poistetaan sentrifugoimalla, supernatantti sijoitetaan anioninvaihtokromatografiaan käyttämällä esim. dietyyliaminoetyyliselluloosaa (esim. DE 52 selluloosapylväs (Whatman, Iso-Britannia)) ja aktiivinen fraktio kerätään.

Ultrasuodatuslaitetta käyttäen suoritettun konsentroinnin jälkeen aktiivinen fraktio laitetaan geelisuodatukseseen, jossa käytetään N,N'-metyleenibisakrylamidi-ristisidottua allyyli-dekstraanipylvästä kuten Sephacryl S-200 (Pharmacia, Ruotsi) pylvästä tai vastaavaa. Kerätty aktiivinen fraktio laitetaan sen jälkeen em. HPL-kromatografiaan. Tällä tavalla voidaan saada keksinnön mukainen glykosyloimaton ihmisen IL-2.

HPL-kromatografiassa käytettävänä käänteisfaasirakennelmana käytetään mm. tehokkaasti hartsia, joka on päällystetty alkyloidulla (C_{1-18}) silaaneilla. Eluenttina on edullista käyttää C_{1-6} alempaa alkoholia (esim. etanolia, propanolia) tai asetonitriiliä ja eluentin pH on 1,5-8, mieluummin 1,5-4. Eluuti nopeus on mieluummin 0,1-100 ml/min.

Täten saatu ihmisen IL-2-proteiini voidaan muuttaa jauheeksi lyofilisoimalla mikäli se on tarpeellista. Lyofilisoitaessa voidaan lisätä stabilisaattoria kuten sorbitolia, mannitolia, dekstroosia, maltoosia, glyserolia tai ihmisen seerumialbumiinia (HSA).

Kun IL-2:den aktiivisuutta määritetään käyttämällä osoittimena solun sisäänsä ottamaa radioaktiivista tydimiiniä IL-2:sta riippuvaisissa hiiren soluissa tämän keksinnön mukaan saatu ihmisen IL-2-proteiinin spesifinen aktiivisuus on yli 1×10^4 U/mg. Keksinnön mukaisesti voidaan saada erittäin puhdasta, glykosyloimatonta ihmisen IL-2-proteiinia, jonka spesifinen aktiivisuus on yli 2×10^4 U/mg ja on aina 4×10^4 U/mg asti.

IL-2 aktiivisuus yksiköissä (U) laskettiin seuraavalla tavalla:

IL-2:ta sisältävä näyte lisättiin liuokseen, joka sisälsi hiiren solulinjan soluja, jotka kasvavat IL-2:den pitoisuudesta riippuen ja koko seosta inkuboitiin 37 °C:ssa yli yön 5% CO₂:den läsnäollessa, mainitun solulinjan solujen kasvu määritettiin käyttäen tritioitua tymidiiniä. Aktiivisuuden laske-
miseksi yksikköinä (U) kyseessä olevassa näytteessä, standardi IL-2:ta (1 U/ml) käytettiin aina vertailuun ja mainittu aktiivisuus yksikköinä laskettiin aktiivisuussuhteesta näytteen ja standardin välillä.

Yksityiskohtaisemmin IL-2:sta riippuvaisia hiiren solulinjan (NKC3) soluja (Hinuma ym., Biochem. Biophys. Res. Commun., 109, 363 (1982)) pidetään jatkoviljelyn avulla yllä RPMI 1640-kasvuliuoksessa, johon on lisätty 20% FCS:a jota on täydennetty IL-2:ta sisältävällä ilmastetulla liuoksella 37 °C:ssa 5% CO₂:den läsnäollessa, pestään kahdesti seerumittomalla RPMI 1640-liuoksella ja suspendoidaan uudelleen 6×10^5 solua/ml RPMI 1640-liuokseen, johon on lisätty 20% FCS:a.

IL-2:ta sisältävä näyte jaetaan 50 µl:n eriin 96-kaivoisen tasapohjaisen mikrotiitterilevyn (Nunc, Tanska) ensimmäisen rivin kaivoihin. Käyttämällä 50 µl:n erää RPMI 1640-liuoksesta, johon on lisätty 20% FCS:a, tehdään kaksinkertainen laimennossarja 12:sta riville saakka. Sitten em. NKC3-solususpensio jaetaan 50 µl:n erissä kaikkiin kaivoihin, mitä seuraa inkubaatio 37 °C:ssa 5% CO₂:den läsnäollessa 24 tuntia. 24 tunnin inkubaation jälkeen lisätään jokaiseen kaivoon 1 µCi tritioitua tymidiiniä (Amersham, Iso-Britannia). Inkubaation jatkuttua 4 tuntia solut kerätään lasisuodattimelle käyttäen solujen kerääjää (Flow, USA) ja tritioidun tymidiinin kerääntyminen niihin mitataan käyttäen nestetuikelaskinta. Suoritettaessa em. määritystä standardi IL-2-näyte on samojen toimenpiteiden kohteena kuin määritettävä näyte ja tritioidun tymidiinin kerääntyminen siihen määritetään.

Aktiivisuuden laskeminen yksikköinä (U) suoritetaan probitmenetelmällä (Journal of Immunology, 120, 2027 (1978)) mukaisesti. Siten maksimikerääntymistä standardi IL-2-näytteen laimennossarjassa pidetään 100%:na ja kerääntymisprosentti (%) kutakin laimennusvaihetta kohti lasketaan. Näin saadut arvot pisteytetään tavalliselle todennäköisyyspaperille ja laimennoskerroin, jossa kerääntyminen on 50% määritetään graafisesti. Myös jokaiselle IL-2:ta sisältävälle näytteelle määritetään laimennoskerroin, jossa kerääntyminen on 50% samalla tavalla. IL-2 aktiivisuuden määrä, jonka kasvatussupernatantti sisältää ihmisen perifeeraalisen veren lymfosyyttien (5×10^6 solua/ml) 48 tunnin inkubaation 37 °C:ssa jälkeen 5% CO₂:den läsnäollessa RPMI 1640-liuoksessa, johon oli lisätty 10% FCS:a ja jota oli täydennetty 40 ug/ml:lla konkanavaliini-A:ta ja 15 ng/ml:lla 12-O-tetradekanoyyliforboli-13-asetaatia, on määritetty 1 U/ml:ksi.

Näytteen IL-2 pitoisuus (U/ml) lasketaan seuraavalla kaavalla:

Näytteen laimennoskerroin, jossa saavutetaan 50%:n kerääntyminen

Standardi IL-2:n laimennoskerroin, jossa saavutetaan 50% kerääntyminen

Luonnollisella ihmisen perifeeraalisesta verestä saadulla IL-2:lla spesifinen aktiivisuus oli 20 000-70 000 U/mg määritettynä em. määritysmenetelmällä. Tämä aktiivisuus on lähes yhtä suuri kuin tämän keksinnön mukaisen ihmisen glykosyloimattoman IL-2-proteiinin aktiivisuus.

Keksinnön mukainen glykosyloimaton ihmisen IL-2-proteiini koostuu mieluummin polypeptidistä (II), jonka aminohappojärjestys osoitetaan kuvassa 3 missä X on Met tai vety.

Keksinnön mukaisesti tuotetulla ihmisen IL-2-proteiinilla on seuraavat ominaisuudet:

- 1) Se on homogeeninen SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesissa ja sen molekyylipaino on $15\ 000 \pm 1000$ daltonia määritettynä mainitulla elektroforeesilla;
- 2) Sen aminotermiinaalinen aminohappo on alaniini tai metioniini;
- 3) Sen karboksitermiinaalinen aminohappo on treoniini;
- 4) Sillä on kasvavien T-solujen tai luonnollisten tappajasolujen vaikutus samalla kun se pitää yllä niiden toiminnot.

Tämän keksinnön mukaisesti tuotettu ihmisen IL-2-proteiini reagoi negatiivisesti limulus lysaattikokeeseen (Haemostasis, 7, 183 (1978)) ja sen proteiiniepäpuhtaus ja pyrogeenisisyys ovat hyvin alhaisia, niin että sitä voidaan turvallisesti käyttää suurina määrinä tuotettuna aineena injeksioiden valmistukseen jne.

Tämän keksinnön mukaisesti saadulla glykosyloimattomalla ihmisen IL-2-proteiinilla on tavallisten T-solujen tai luonnollisten tappajasolujen kasvua edistävä vaikutus samalla kun se pitää yllä niiden toimintoja. Siksi keksinnön mukaista IL-2-proteiinia voidaan käyttää T-solujen tai luonnollisten tappajasolujen kasvattamiseen tai jatkoviljelyyn in vitro pitkinä ajanjaksoina, tai niiden kloonamiseen.

Tätä ominaisuutta voidaan lisäksi käyttää hyväksi ihmisen IL-2:den aktiivisuuden mittaamisessa.

Lisäksi keksinnön mukainen ihmisen IL-2-proteiini tekee mahdolliseksi kasvattaa valikoivasti antigeenispesifisiä tappaja-T-soluja in vitro, jotka tunnistavat ja tuhoavat tuumoriantigeenejä, tai luonnollisia tappajasoluja, jotka kykenevät tappamaan kasvainsoluja riippumatta antigeenisen herkistymisen olemassaolosta tai sen puuttumisesta. Kun tämän keksinnön

mukainen ihmisen IL-2 ympätään elävään organismiin samanaikaisesti mainittujen tappajasolujen siirtämisen kanssa, se lisää tappaja-T-solujen antituumorivaikutusta. Siksi sitä voidaan käyttää kasvainten ehkäisyyn tai hoitoon tai immunodesiensi-sairauksien hoitoon lämmilverisillä eläimillä (esim. hiiri, rotta, kani, koira, kissa, sika, hevonen, nauta, ihminen).

Keksinnön mukainen ihmisen IL-2-proteiini on hyvin puhdistettu tuote, sen antigeenisuus ihmistä kohtaan on vähäinen ja sen toksisuus on alhainen.

Kasvainten hoitoon ja ehkäisyyn käytettävänä aineena keksinnön mukainen ihmisen IL-2-proteiini voidaan antaa joko parenteraalisesti tai oraalisesti esim. injektioina tai kapseleina, jotka on valmistettu sekoittamalla tai laimentamalla sitä sopivasti sellaisenaan tunnetun kantajan kanssa. Sitä voidaan käyttää joko yksinään tai yhdessä tappaja-T-solujen tai luonnollisten tappajasolujen kanssa, jotka on kasvatettu in vitro kuten tässä edellä on mainittu.

Keksinnön mukaisella ihmisen IL-2-proteiinilla on suurin piirtein sama biologinen aktiivisuus kuin luonnollisella ihmisen IL-2:lla ja niinpä sitä voidaan käyttää samalla tavoin kuin mainittua luonnollista ainetta. Sen dissosiaatiovakio suhteessa reagoivien solujen IL-2-reseptoreihin on hyvin pieni, niin että hyvin pieni annos on riittävä useimmissa tapauksissa.

T-solujen in vitro kasvattamista varten keksinnön mukaista ihmisen IL-2:ta voidaan lisätä liuokseen pitoisuutena noin 0,01-1 U/ml, mieluummin noin 0,1-0,5 U/ml.

Esimerkissä keksinnön mukaisen IL-2-proteiinin käytöstä T-solujen kasvattamiseen in vitro sitä lisätään pitoisuutena 0,1-0,5 U/ml solususpensioon, joka sisältää esim. alloantigeeniherkistettyjä T-soluja, jotka on saatu ihmisen periferallisesta verestä peräisin olevien T-solujen 3 vrk sekoitetusta lymfosyyttikasvatuksesta (1×10^6 solua/ml) yhdessä B-solu-

transformanttien kanssa (1×10^6 solua/ml) joita on röntgensäteilytetty (1500 radia) RPMI 1640 liuoksessa, joka sisältää 20% naudan sikiön seerumia. Kasvatusta jatketaan noin 1 kk vaihtaen kasvatusliuos noin viikon välein.

Seuraavissa esimerkeissä esiintunut transformantti, Escherichia coli DH1/pTF4, on talletettu Institute for Fermentationiin, Osakaan (IFO) talletusnumerolla IFO-14299, ja myös Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry, Japanin (FRI) talletusnumerolla FERM BP-628 Budapestin sopimuksen mukaisesti.

Tässä selityksessä ja piirustuksissa emäkset ja aminohapot, milloin ne on osoitettu lyhentein, on lyhennetty IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclaturen sääntöjen tai vallitsevan käytännön mukaan. Esimerkkejä esitetään taulukossa 1. Kun kyseessä on optinen isomeria mainitut aminohapot ovat L-muodossa ellei erityisesti muutoin osoiteta.

Taulukko 1

DNA:	Deoksiribonukleiinihappo
cDNA:	Komplementaarinen deoksiribonukleiinihappo
A:	Adeniini
T:	Tymiini
G:	Guaniini
C:	Sytosiini
RNA:	Ribonukleiinihappo
mRNA:	Lähetti-ribonukleiinihappo
dATP:	Deoksiadenosiinitrifosfaatti
dTTP:	Deoksitymidiinitrifosfaatti
dGTP:	Deoksiguanosiinitrifosfaatti
dCTP:	Deoksisytidiinitrifosfaatti
ATP:	Adenosiinitrifosfaatti
EDTA:	Etyleenidiamiinitetraetikkahappo
SDS:	Natriumdodekylsulfaatti

Gly:	Glysiini
Ala:	Alaniini
Val:	Valiini
Leu:	Leusiini
Ile:	Isoleusiini
Ser:	Seriini
Thr:	Treoniini
Cys:	Kysteiini
1/2 Cys:	Puoli kysteiiniä
Met:	Metioniini
GLu:	Glutamiinihappo
Asp:	Asparagiinihappo
Lys:	Lysiini
Arg:	Arginiini
His:	Histidiini
Phe:	Fenyylialaniini
Tyr:	Tyrosiini
Trp:	Tryptofaani
Pro:	Prolini
Asn:	Asparagiini
Gln:	Glutamiini

Lyhyt piirrosten kuvaus:

Kuva 1 ja kuva 2 kuvaavat plasmidin pILOt135-8, joka on saatu viite-esimerkissä 1 (vii), restriktioentsyymikartan () osoittaa signaali-peptidiä koodaavaa aluetta ja  osoittaa IL-2:ta koodaavaa aluetta) ja mainitun plasmidin primaarirakenteen (emäsjärjestyksen) tässä järjestyksessä. Kuva 3 kuvaa keksinnön mukaisen glykosyloimattoman ihmisen IL-2-proteiinin aminohappojärjestyksen, missä X on Met tai vetyioni. Kuva 4 osoittaa ekspressiovektorin pTF4:n suunnittelukaavion siten kun se on tehty viite-esimerkissä 2. Kuva 5 osoittaa esimerkissä 1(V) (1) ja (2) suoritettua SDS-polyakrylamidi slabgeeli elektroforeesitulokset. Kuvassa 6 on trypsiinillä pilkkomalla saatu peptidikartta, joka on mainittu esimerkissä 1 (V) (6), ja kuvassa 7 ja kuvassa 8 keksinnön

mukaisen ihmisen IL-2-proteiinin vaikutukset tritiodun tymidiinin kerääntymisen NKC3-solulinjassa ja ihmisen solulinjassa tässä järjestyksessä kuten esimerkissä 1 (V) (7) osoitetaan. Kuva 9 osoittaa pitkäaikaisen NKC3-solulinjan jatkokasvatuksen, joka on tehty esimerkissä 1 (V) (7), tulokset.

Viite-esimerkki 1

(i) Ihmisen IL-2:ta koodaavan mRNA:n eristäminen

Ihmisen perifeeraalisesta verestä valmistettuja lymfosyyttejä inkuboitiin RPMI 1640-kasvuliuoksessa, johon oli lisätty 10% naudan sikiön seerumia, 12-o-tetradekanoyyliforboli-13-asettaattia (TPA) (15 ng/ml) ja konkavaliini-A:ta (40 µg/ml) 37 °C:ssa, jotta IL-2 indusoituisi. 24 tunnin inkubaation jälkeen 1×10^{10} näin indusoitunutta ihmisen lymfosyyttiä hajoitettiin ja denaturoitiin liuoksessa, joka sisälsi 5 M guanidiinitiosyanaattia, 5% merkaptoetanolia, 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) ja 10 mM EDTA käyttämällä Teflon-homogenisaattoria, sitten lisättiin natrium-N-lauroyylisarkosinaattia 4%:n pitoisuuteen ja homogenisaation jälkeen seos pantiin kerrokseksi 6 ml:n 5,7 M kesiumkloridiliuoksen päälle (5,7 M kesiumkloridia, 1 M EDTA) ja sentrifugoitiin käyttämällä Beckman SW28 roottoria 24000 rpm 15 °C:ssa 48 tuntia, jotta saataisiin RNA-sakka. Tämä RNA-sakka liuotettiin 0,25% natrium-N-lauroyylisarkosinaattiin ja sakkautettiin etanolilla, jolloin saatiin 10 mg RNA:ta. Tämä RNA kiinnitettiin hyvin suolapitoisessa liuoksessa (0,5 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,3% SDS) oligo(dT)selluloosapylvääseen. Eluutio vähäisen suolapitoisuuden omaavalla liuoksella (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,3% SDS) antoi 300 µg poly(A):ta sisältävää mRNA:ta. Tämä mRNA sakkautettiin edelleen etanolilla, liuotettiin sitten 0,2 ml:aan liuosta (10 mM Tris-HCl pH 7,6, 2 mM EDTA, 0,3% SDS), käsiteltiin 65 °C:ssa 2 minuuttia ja fraktioitiin 10-35% soke-ritiheysgradienttisentrifugaatiolla (20 °C:ssa 25000 rpm 21 tuntia käyttämällä Beckman SW28 roottoria) 22 fraktioon. Yhtä suuri erä kustakin fraktiosta injektointiin *Xenopus* laeviksen oosyytteihin ja IL-2 aktiivisuus näin syntetisoiduissa prote-

iineissa mitattiin. Fraktioissa no 11-15 (sedimentaatiovakio 8S-15S) havaittiin olevan IL-2 aktiivisuutta. Näihin fraktioihin sisältyi noin 25 μg IL-2 mRNA:ta.

(ii) Yksijuosteisen DNA:n syntetisoiminen

Edellä saatua mRNA:ta ja käänteiskopijoijaentsyymiä käyttämällä suoritettiin inkubaatio 100 μl :ssa reaktioliuosta (5 μg oligo(dT):tä, 100 yksikköä käänteiskopijoijaentsyymiä, 1 mM dATP, 1 mM dCTP, 1 mM dGTP, 1 mM dTTP, 8 mM MgCl_2 , 50 mM KCl, 10 mM ditiotreitol, 50 mM Tris·HCl pH 8,3) 42 °C:ssa 1 tunti, mitä seurasi proteiinien poisto fenolilla ja käsittely 0,1 N NaOH:lla 70 °C:ssa 20 minuuttia RNA:n poistamiseksi hajoittamalla se.

(iii) Kaksijuosteisen DNA:n syntetisoiminen

Kaksijuosteinen DNA syntetisoitiin käsittelemällä edellä syntetisoitu yksijuosteinen komplementaarinen DNA 50 μl :ssa reaktioliuosta (sama kuin em. reaktioliuos paitsi että mRNA ja oligo(dT) puuttuvat) 42 °C:ssa 2 tuntia.

(iv) dC-hännän lisääminen

Tämä kaksijuosteinen DNA käsiteltiin S1-nukleaasilla 50 μl :ssa reaktioliuosta (kaksijuosteinen DNA, 0,1 M natriumasettaatti pH 4,5, 0,25 M NaCl, 1,5 mM ZnSO_4 , 60 yksikköä S1-nukleaasia) huoneenlämpötilassa 30 minuuttia, mitä seurasi proteiinien poisto fenolilla ja DNA:n saostaminen etanolilla. DNA käsiteltiin terminaalitransferaasilla 50 μl :ssa reaktioliuosta (kaksijuosteinen DNA, 0,14 M kaliumkakodylaatti, 0,3 M Tris (emäs) pH 7,6, 2 mM ditiotreitol, 1 mM CoCl_2 , 0,15 mM dCTP, 30 yksikköä terminaalitransferaasia) 37 °C:ssa 3 minuuttia, mikä aiheutti kaksijuosteisen DNA:n pidentymisen noin 15 deoksisytidiinillä molemmissa 3'-päissä. Tämä reaktiosarja tuotti noin 300 ng deoksisytidiiniketjua sisältävää kaksijuosteista DNA:ta.

(v) Escherichia coli-plasmidin katkaiseminen ja dG-hännän liittäminen

10 μg Escherichia coli-plasmidin pBR322 DNA:ta käsiteltiin yksitellen restriktioentsyymi PstI:llä 50 μl :ssa reaktio-
liuosta (10 μg DNA:ta, 50 mM NaCl, 6 mM Tris-HCl pH 7,4, 6 mM MgCl_2 , 6 mM 2-merkaptetaanoli, 100 $\mu\text{g/ml}$ naudan seerumialbu-
miinia, 20 yksikköä PstI:tä) 37 °C:ssa 3 tuntia plasmidin
katkaisemiseksi pBR322 DNA:ssa sijaitsevassa yhdessä PstI-
tunnistuskohdassa, mitä seurasi proteiinien poisto fenolilla.
Katkaistua plasmidi pBR322 DNA:ta pidennettiin noin 17 deoksi-
guaniinilla molemmissa 3'-päissä käsittelemällä sitä termi-
naalitransferaasilla 50 μl :ssa reaktioliuosta (10 μg DNA:ta,
0,14 M kaliumkakodylaattia, 0,3 M Tris-emästä pH 7,6, 2 mM
ditiotreitol, 1 mM CoCl_2 , 0,15 mM GTP, 30 yksikköä terminaali-
transferaasia) 37 °C:ssa 3 minuuttia.

(vi) cDNA:n liittäminen ja Escherichia coli transformointi

Näin saatu synteettinen kaksijuosteinen DNA (0,1 μg) ja 0,5
 μg em. plasmidi pBR322:ta liitettiin yhteen kuumentamalla
niitä 0,1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7,6 ja 1 mM EDTA sisältä-
vässä liuoksessa 65 °C:ssa 2 minuuttia ja pitämällä sitten
45 °C:ssa 2 tuntia, mitä seurasi liuoksen asteittainen viilen-
täminen, ja tuotetta käytettiin Escherichia coli MM294:n
transformointiin Enean ym. (J. Mol. Biol., 96, 495 (1975))
menetelmän mukaisesti.

(vii) cDNA:ta sisältävän plasmidin eristäminen

Tällä tavalla eristettiin noin 20000 tetrasykliiniresistenttiä
transformanttia. Kaikkien näiden DNA:t sidottiin nitrosellu-
loosasuodattimelle. Taniguchin ym. (Nature, 302, 305 (1983))
ilmoittamaan IL-2:den aminohappojärjestykseen perustuen synte-
tisoitiin kemiallisesti vastaavien emäsjärjestysten oligo-
nukleotidit ($5'$ AAA CAT CTT CAG TGT $3'$ ja $5'$ ACA TTC ATG TGT

GAA^{3'}), jotka vastasivat aminohappoja no 74-78 (Lys-His-Leu-Gln-Cys) ja aminohappoja no 122-126 (Thr-Phe-Met-Cys-Glu) tässä järjestyksessä fosfotriesterimenetelmällä (Crea, R. ym., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765 (1978)).

Nämä oligonukleotidit leimattiin ³²P:llä 5'-päästään käsittelemällä ne T4-polynukleotidikinaasilla 50 ul:ssa reaktio-liuosta (0,20 ug oligonukleotidiä, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM MgCl₂, 10 mM 2-merkaptotaetanol, 50 uCi -³²P-ATP, 3 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia) 37 °C:ssa 1 tunti. Nämä leimatut oligonukleotidit, jotka toimivat koettimina, liitettiin nitroselluloosasuodattimeen sidottuihin DNA:hin Lawn'in ym. (Nucleic Acids Res., 9, 6103 (1981)) menetelmällä. Neljä transformanttia, jotka reagoivat kahden oligonukleotidikoettimen kanssa, havaittiin autoradiografialla. Plasmidi-DNA eristettiin kaikkien näiden transformanttien soluista Birnboim-Doly alkalimenetelmällä (Birnboim, H. C. & Doly, J., Nucleic Acids Res., 7, 1513 (1979)). Sitten plasmidissa oleva insertti leikattiin irti käyttämällä restriktioentsyymi PstI:tä. Eristetyistä plasmideista valittiin se, joka sisälsi pisimmän inserttifragmentin ja sille annettiin nimi pILOT 135-8. Tämän plasmidin restriktioentsyymikartta esitetään kuvassa 1.

Tähän pILOT 135-8:aan liitetyn cDNA:n primaarirakenne (emäsjärjestys) määritettiin dideoksimenetelmällä ja Maxam-Gilbertmenetelmällä. Näin määritetty primaarirakenne esitetään kuvassa 2. Tämän emäsjärjestyksen pohjalta määritetty peptidi käsittää 153 aminohappoa ja se alkaa synteessin aloitussignaalinla (no:t 64-66 ATG). Näistä signaalipeptidinä pidetään 20 ensimmäistä aminohappoa N-terminaalista lähtien. Em. primaarirakenne on paljastanut, että tässä plasmidissa on koko ihmisen IL-2-proteiinia koodaava emäsjärjestys. Tämä osoittaa, että mainittuun plasmidiin liittyneen geenin liittäminen sopivaan ekspressioplasmidiin voi johtaa IL-2-proteiinin polypeptidi-
osan tuottamiseen.

Viite-esimerkki 2

Viite-esimerkissä 1 saatu plasmidi pILOT 135-8 pilkottiin restriktioentsyymillä HgiI. Näin saatu 1294 emäsparia pitkä DNA-fragmentti, joka sisälsi IL-2-geenin, käsiteltiin T4-DNA-polymeraasilla, siihen liitettiin ClaI-linkkeri CGATA ATG GCA, joka sisälsi alaniinin kodonin ja metioniinin kodonin ATG, ja tuote käsiteltiin ClaI:llä ja PstI:llä, mitä seurasi liittämisen ptrp 771:een ClaI-PstI kohdalla. Näin saatua ekspressio-plasmidia kutsuttiin pTF4:ksi (kuva 4).

Viite-esimerkki 3

Escherichia coli DH1 transformoitiin viite-esimerkissä 2 saadulla plasmidilla pTF4:llä Cohen'in ym. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)) menetelmän mukaisesti, jolloin saatiin mainitun plasmidin sisältävä transformantti (Escherichia coli DH1/pTF4).

Esimerkki 1

(i) Escherichia coli DH1/pTF4 (saatu viite-esimerkissä 3) ympätettiin 50 ml:aan kasvatusliuosta (pH 7,0), joka sisälsi 1% Bacto tryptonia (Difco Laboratories, USA), 0,5% Bacto hiiva-utetta (Difco Laboratories, USA), 0,5% natriumkloridia ja 7 μ g/ml tetrasykliiniä 250 ml:n erlenmeyer-pullossa. Kasvatusliuosta inkuboitiin yön yli 37 °C:ssa ravistelussa, jonka jälkeen se siirrettiin 5 litran pöytäfermentoriin, joka sisälsi 2,5 litraa M9-kasvatusliuosta, joka sisälsi 0,5% kas-aminohappoja, 0,5% glukoosia ja 7 μ g/ml tetrasykliiniä. Inkubaatiota jatkettiin sitten ilmastaen ja sekoittaen 37 °C:ssa 4 tuntia ja edelleen 4 tuntia 3- β -indolyyliakryyli-hapon (25 μ g/ml) lisäämisen jälkeen. Solut kerättiin näin saadusta 2,5 litran kasvatusliuoksesta sentrifugoimalla, jäädytettiin -80 °C:ssa ja varastoitiin.

(ii) Esimerkissä 1(i) saadut jäädytettynä säilytetyt solut

(12,1 g) suspendoitiin 100 ml:aan uuttopuskuria (pH 7,0), joka sisälsi 7 M guanidiinivetykloridia ja 0,1 M Tris-HCl, suspensiota sekoitettiin 4 °C:ssa 1 tunti ja lyaattia sentrifugoitiin 28000 x g 20 minuuttia, jolloin saatiin 93 ml supernatanttia.

(iii) Useita menetelmiä käytettiin yksitellen IL-2:den uuttamiseksi transformantti Escherichia coli DH1/pTF4 soluista, jotka oli saatu esimerkin 1(i) menetelmällä kunkin menetelmän uuttamistehokkuuden vertailemiseksi.

Lysotsyymi-EDTA-menetelmässä 2 g Escherichia coli DH1/pTF4 soluja, jotka oli saatu esimerkissä 1(i) sekoitettiin 16 ml:aan liuosta (pH 7,0), joka sisälsi 0,1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA ja 250 mg/l lysotsyymiä, seosta sekoitettiin 4 °C:ssa 1 tunti ja myöhemmin 37 °C:ssa 5 minuuttia ja lyaattia sentrifugoitiin 28000 x g 20 minuuttia.

Sonikaatiomenetelmässä 2 g em. soluja suspendoitiin 16 ml:aan liuosta (pH 7,0), joka sisälsi 0,1 M Tris-HCl, suspensiota sonikoitiin 0 °C:ssa 5 minuuttia ja lyaattia sentrifugoitiin 28000 x g 20 minuuttia.

Guanidiini-HCl-menetelmässä 2 g em. soluja sekoitettiin 16 ml:aan liuoksia (pH 7,0), jotka sisälsivät 0,1 M Tris-HCl ja 2 M, tai 4 M tai 7 M guanidiini-HCl, seoksia sekoitettiin 4 °C:ssa 1 tunti ja lyaatteja sentrifugoitiin 28000 x g 20 minuuttia. Näin saaduista supernatanteista määritettiin proteiinipitoisuus ja IL-2-aktiivisuus.

Tulosten yhteenveto esitetään taulukossa 2.

Taulukko 2. IL-2:den uuttaminen

Uuttamis- menetelmä	Proteiini- pitoisuus (mg/ml)	Uutteen IL-2 aktiivisuus (U/ml)	Suhdeluku (%)
Lysotsyymi- EDTA	5,40	3,3	0,02
Sonikaatio	6,54	2,2	0,01
2M GU·HCl	2,60	46	0,2
4M Gu·HCl	4,12	144	0,8
7M Gu·HCl	7,22	19100	100

 Gu·HCl: Guanidiinivetykloridi

(iv) Esimerkissä 1(ii) saatu supernatantti dialysoitiin 0,01 M Tris-HCl-puskuria (pH 8,5) vastaan ja sitten se sentrifugoitiin 19000 x g 10 minuuttia, jolloin saatiin 94 ml dialysoitua supernatanttia. Tämä pantiin DE 52 (DEAE-selluloosa, Whatman, Iso-Britannia) pylvääseen (50 ml:n tilavuudessa), joka oli tasapainotettu 0,01 M Tris-HCl-puskurilla (pH 8,5) proteiinien adsorptiota varten. Proteiinit eluoitiin lineaarisella NaCl-pitoisuusgradientilla (0-0,15 M NaCl, 1 litra). Aktiiviset fraktiot (53 ml) konsentroitiin 4,8 ml:ksi käyttämällä YM-5 membraania (Amicon, USA) ja geelisuodatettiin käyttämällä Sephacryl S-200 (Pharmacia, Ruotsi) pylvästä (500 ml tilavuudeltaan), joka tasapainotettiin 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0)-1 M NaCl puskurilla. Saadut aktiiviset fraktiot (28 ml) konsentroitiin 2,5 ml:ksi käyttäen YM-5 membraania. Konsentraatti pantiin Ultrapore RPSC (Altex, USA) pylvääseen adsorptiota varten ja HPL-kromatografia suoritettiin käyttäen liikkuvana faasina trifluorietikkahappoasetonitriilisysteemiä.

Käytetyt olosuhteet: pylväs, Ultrapore RPSC (4,6 x 75 mm); pylvään lämpötila, 30 °C; liuotin A, 0,1% trifluorietikkahappo-99,9% vesi; liuotin B, 0,1% trifluorietikkahappo-99,9%

asetonitriili; eluutio-ohjelma, minuutti 0 (68% A + 32% B) -minuutti 25 (55% A + 45% B) -minuutti 35 (45% A + 55% B) -minuutti 45 (30% A + 70% B) -minuutti 48 (100% B); eluuti nopeus, 0,8 ml/min.; määrittäminen allonpituudella 230 nm. Aktiivinen fraktio kerättiin noin 39 minuutin retentioaikana. Näin saatiin 10 ml liuosta, joka sisälsi 0,53 mg glykosyloimatonta ihmisen IL-2-proteiinia (spesifinen aktiivisuus 30000 U/mg; aktiivisuuden takaisin saaminen aloitusmateriaalista 30,6%; proteiinin puhtaus 99% (määritettynä densitometrisesti SDS-polyakryyliamidigeelielektroforefogrammilla)):

Em. liuoksen lyofilisointi tuotti valkeaa jauhetta. Jauheen spesifinen aktiivisuus oli 26000 U/mg.

(V) Esimerkissä 1(iv) saadusta ihmisen IL-2-proteiinista tutkittiin seuraavat ominaisuudet:

(1) Homogeenisuus:

Värjäys Coomassie Brilliant Blue:lla, jota seurasi SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesi Laemmliin ym. mukaan (Nature, 227, 680 (1970)) toi näkyviin ainoastaan yhden mainittua ihmisen IL-2-proteiinia edustavan juovan (katso kuva 5). Juovan sijainti oli muuttumaton sekä pelkistävässä olosuhteissa että ei-pelkistävässä olosuhteissa.

(2) Molekyylipaino:

Mainitun ihmisen IL-2-proteiinin molekyylipainon laskettiin olevan noin 15000 daltonia perustuen SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesiin (ks. kuva 5).

(3) Aminohappokoostumus:

20 µg:n erä mainittua ihmisen IL-2-proteiinia laitettiin lasiseen koeputkeen hydrolyysiä varten, johon lisättiin vakiomäärä kiehuva suolahappoa, joka sisälsi 4% tioglykolihappoa,

putki suljettiin vakuumiin ja hydrolyysi suoritettiin 110 °C:ssa 24, 48 ja 72 tuntia. Hydrolyysin jälkeen putki aukaistiin, suolahappo poistettiin alennetussa paineessa ja tähde liuotettiin 0,02 N suolahappoon ja aminohappoanalyysi suoritettiin käyttämällä Hitachin malli 835 aminohappoanalyysaattoria. Kystiinin ja kysteiinin määrittämiseksi mainittu ihmisen IL-2-proteiini hapetettiin performihapolla Hirsin menetelmän mukaan (Methods in Enzymol., 11, 197 (1967)), mitä seurasi hydrolyysi vakiomäärässä kiehuvaa suolahappoa alennetussa paineessa 24 tuntia. Hydrolysaatista määritettiin kysteiinihappo käyttämällä aminohappoanalyysaattoria. Em. analyysistä saadut tulokset osoitetaan taulukossa 3. Kaikki arvot ovat keskiarvoja kolmesta 24, 48, ja vastaavasti 72 tunnin hydrolyysin jälkeen saadusta arvosta paitsi seriinin ja treoniinin arvot, jotka määritettiin ekstrapoloimalla hydrolyysin aloitusaikaan.

Taulukko 3

Aminohappo	Mooli %
Asp/Asn	8,8
Thr	9,3
Ser	5,7
Glu/Gln	13,7
Pro	3,4
Gly	1,7
Ala	3,8
1/2 Cys	2,3
Val	3,1
Met	3,7
Ile	6,3
Leu	16,3
Tyr	2,3
Phe	4,5
Lys	8,3
His	2,5

Arg	3,1
Trp	1,1

(4) N-terminaalinen aminohappojärjestys

34 g:n erä mainittua ihmisen IL-2-proteiinia analysoitiin N-terminaalisen aminohappojärjestyksen määrittämiseksi käyttämällä hyväksi automaattista Edman degradaatiomenetelmää käyttämällä kaasufaasiproteiinisekvenssoijaa (malli 470A, Applied Biosystems, USA). Fenyylitiohydantoiiniaminohapot (PTH-aminohapot) tunnistettiin HPL-kromatografialla käyttämällä Micropak-SP pylvästä (Varian, USA). Kussakin vaiheessa havaittu aminohappo tai aminohapot osoitetaan taulukossa 4.

Taulukko 4

Vaihe	Havaittu PTH-aminohappo
-------	-------------------------

1	Ala
	Met
2	Pro
	Ala
3	Thr
	Pro
4	Ser
	Thr
5	Ser
6	Ser
7	Thr
8	Lys
9	Lys
10	Thr
11	Gln
12	Leu
13	Gln
14	Leu

15	Glu
16	Y*
17	Leu
18	Leu
19	Leu
20	Asp

* ei ole vielä määritetty

(5) C-terminaalin aminohappo:

33 µg:n erä mainitusta ihmisen IL-2-proteiinista laitettiin lasiseen koeputkeen hydratsiinilla hajoittamista varten, 0,05 ml vedetöntä hydratsiinia lisättiin siihen ja putki suljettiin vakuumiin ja lämmitettiin 100 °C:een kuudeksi tunniksi. Saatu hydratsiinilla hajoitettu tuote lyofilisoitiin ja liuotettiin tislattuun veteen. Liuokseen lisättiin bentsaldehydiä, seosta sekoitettiin huoneen lämpötilassa 1 tunti ja sitten se sentrifugoitiin. Näin saatu vesikerros lyofilisoitiin ja siitä tehtiin aminohappoanalyysi käyttämällä Hitachi malli 835 aminohappoanalysaattoria. Ainoastaan treoniini havaittiin.

(6) Peptidikarttoitus trypsiinin avulla

15 µg:n erä mainittua IL-2 näytettä pilkottiin 0,4 µg:lla trypsiiniä (Washington, USA) 120 µl:ssa 0,02 M natriumvetykarbonaattia 37 °C:ssa 18 tuntia. Sitten lisättiin 5 µl 2-merkapttoetanolia ja reaktiota jatkettiin 37 °C:ssa edelleen 2 tuntia. Tämän jälkeen reaktio lopetettiin lisäämällä 75 µl 1% trifluorietikkahappoa. HPL-kromatografia, joka suoritettiin alla annetuissa olosuhteissa, antoi reaktioseoksesta kuvassa 6 osoitetun kartan.

Pylväs: Ultrasphere-Octyl (5 µm, 4,6 x 250 mm; Altex, USA);
Pylvään lämpötila: 30 °C;

Liikkuva faasi:

Liuotin A, 0,02% trifluorietikkahappo-99,98% vesi

Liuotin B, 0,02% trifluorietikkahappo-99,98% asetonitriili

Minuutti 0 (95% liuotin A + 5% liuotin B) - minuutti 40 (30% liuotin A + 70% liuotin B)

Virtausnopeus: 1,0 ml/minuutti;

Osoitus: Fluoresenssimenetelmä (Analytical Biochem., 67, 438 (1975)) fluoreskamiinia käyttäen (Roche, USA)

(7) Vaikutus IL-2:sta riippuvaisiin soluihin

Keksinnön mukaisen glykosyloimattoman ihmisen IL-2-proteiinin määrittäminen on kuvattu Biochem. Biophys. Res. Commun., 109, 363 (1982). Se osoitti, että mainitulla IL-2-proteiinilla on kyky edistää tritiodun tymidiinin sisäänottoa IL-2:sta riippuvaisessa hiiren solulinjassa (ks. kuva 8).

Lisäksi mainittu IL-2-proteiini liuotettiin RPMI-1640 liuokseen, johon oli lisätty 20% FCS:ää, pitoisuuteen 0,5 U/ml, ja 2×10^5 solua/ml NKC3 solulinjaa suspendoitiin liuokseen. Jatkokasvatusta jatkettiin Linbro Multi dish-astioissa (Flow, USA) 37 °C:ssa 5% CO₂:ssa toistaen samalla elävien solujen laskenta ja kasvatuksen suspendointi uuteen tuoreeseen liuokseen 2 tai 3 päivän välein. Tuloksena havaittiin mainitulla IL-2-proteiinilla olevan kykyä pitää yllä NKC3-solulinjan kasvua pitkän ajanjakson aikana kuten kuvassa 9 osoitetaan.

Esimerkki 2 (injektion valmistus)

Esimerkissä 1(iv) saatu glykosyloimaton ihmisen IL-2-proteiinia sisältävä liuos laitettiin CM Toyopearl (Toyo Soda, Japani) pylvääseen, joka oli tasapainotettu 0,025 M ammoniumasetaatipuskurilla (pH 5,0) aseptisissä olosuhteissa adsorptiota varten, mitä seurasi eluutio yllä mainitulla puskurilla, joka sisälsi 0,15 M NaCl. Eluaatti liuotettiin lisäämällä riittävä määrä 0,15 M NaCl, sitten lisättiin HSA:ta pitoisu-

teen 0,5% ja seos suodatettiin membraanisuodattimen läpi (huokosen halkaisija 0,22 μ m). Suodos jaettiin aseptisesti 1 ml:n eriin pieniin lääkepulloihin, minkä jälkeen seurasi lyofilisointi. Ihmisen IL-2-valmiste injektioita varten liuotettiin 1 ml:aan tislattua vettä kussakin pienessä lääkepullossa ennen käyttöä.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä olennaisesti puhtaan glykosyloimattoman ihmisen interleukiini-2-proteiinin valmistamiseksi, jonka proteiinin spesifinen aktiivisuus on vähintään 10^4 U/mg, jonka puhtaus on vähintään 99 %, jolla esiintyy vain yksi juova SDS-polyakryyliamidi-geeli-elektroforeesianalyysissä sekä pelkistävässä että ei-pelkistävässä olosuhteissa ja joka on olennaisesti endotoksiinia ja pyrogeenia sisältämätön, t u n n e t t u siitä, että kasvatetaan Escherichia colin transformanttia, joka sisältää ihmisen interleukiini-2:ta koodaavan emäsjärjestyksen omaavan DNA:n, siten, että aiheutuu ihmisen interleukiini-2:den tuotto ja karttuminen kasvatusliuokseen, ja saateetaan näin saatu ihmisen interleukiini-2:ta sisältävä liuos puhdistusmenetelmään, joka soveltaa HPL-kromatografiaa, jossa käytetään käänteisfaasipylvästä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kromatografia suoritetaan käyttämällä eluenttia, jonka pH on 1,5-8.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kromatografia suoritetaan virtausnopeudella 0,1-100 ml/min.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ihmisen interleukiini-2:ta tuotetaan ja kartutetaan kasvavissa transformanttisoluihin ja ihmisen interleukiini-2 uutetaan soluista, jolloin saadaan ihmisen interleukiini-2:ta sisältävää nestettä.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ihmisen interleukiini-2 uutetaan liuoksella, jossa on proteiinia denaturoivaa ainetta.

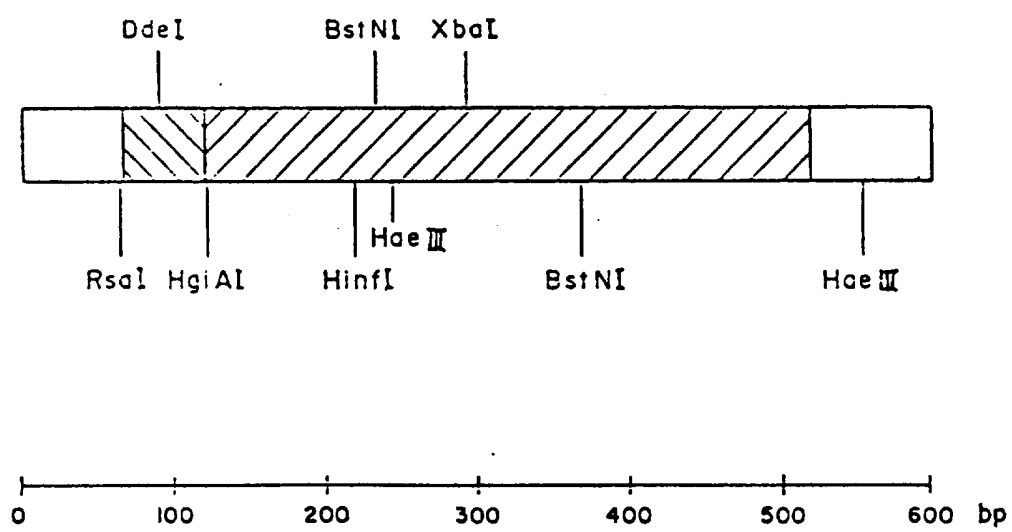
6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ihmisen interleukiini-2 uutetaan guanidiinisulolan liuoksella, jonka konsentraatio on 2-8 M.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av väsentligen rent oglykosylerat humant interleukin-2-protein med en specifik aktivitet om minst 10^4 U/mg och en renhet om minst 99 %, som uppvisar ett enda band vid analys med SDS-polyakrylamidelektrofores under såväl reducerande som icke-reducerande betingelser och som är väsentligen fritt från endotoxin och pyrogen, k ä n n e t e c k n a t av, att man odlar en transformant av Escherichia coli, som innehåller en DNA med en bassekvens som kodar för humant interleukin-2 så, att man åstadkommer produktion och ackumulation av humant interleukin-2 i odlingsmediet, och underkastar den så erhållna humant interleukin-2-innehållande lösningen ett reningsförfarande som utnyttjar HPL-kromatografi med en revers-fas kolonn.
2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av, att kromatografen utförs under användande av en eluent med pH 1,5-8.
3. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av, att kromatografen utförs med strömningshastigheten 0,1-100 ml/min.
4. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t av, att humant interleukin-2 produceras och ackumuleras i växande transformantceller och att det humana interleukinet-2 extraheras ur cellerna, varvid man erhåller en vätska som innehåller humant interleukin-2.
5. Förfarande enligt patentkravet 4, k ä n n e t e c k n a t av, att det humana interleukinet-2 extraheras med en lösning som innehåller proteindenaturerande ämne.
6. Förfarande enligt patentkravet 5, k ä n n e t e c k n a t av, att det humana interleukinet-2 extraheras med en lösning av ett guanidinsalt med en koncentration om 2-8 M.

81118

KUVIO 1



81118

KUVIO 2

5' GGGGGGGGGGGGGGGGGGATCACTCTCTTTAATCACTACTCACAGTAACC
S1
TCAACTCCTGCCACA ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT TGC
S20 1
ATT GCA CTA AGT CTT GCA CTT GTC ACA AAC AGT GCA CCT
ACT TCA AGT TCT ACA AAG AAA ACA CAG CTA CAA CTG GAG
20
CAT TTA CTG CTG GAT TTA CAG ATG ATT TTG AAT GGA ATT
40
AAT AAT TAC AAG AAT CCC AAA CTC ACC AGG ATG CTC ACA
TTT AAG TTT TAC ATG CCC AAG AAG GCC ACA GAA CTG AAA
60
CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC AAA CCT CTG GAG
80
GAA GTG CTA AAT TTA GCT CAA AGC AAA AAC TTT CAC TTA
AGA CCC AGG GAC TTA ATC AGC AAT ATC AAC GTA ATA GTT
100
CTG GAA CTA AAG GGA TCT GAA ACA ACA TTC ATG TGT GAA
TAT GCT GAT GAG ACA GCA ACC ATT GTA GAA TTT CTG AAC
120
AGA TGG ATT ACC TTT TGT CAA AGC ATC ATC TCA ACA CTG
133
ACT TGA TAATTAAGTGCTTCCCACTTAAAACATATCAGGCCTTCTATTT
ATTTAAATATTTAAATTTTACCCCCCCCCCCCCCCC3'

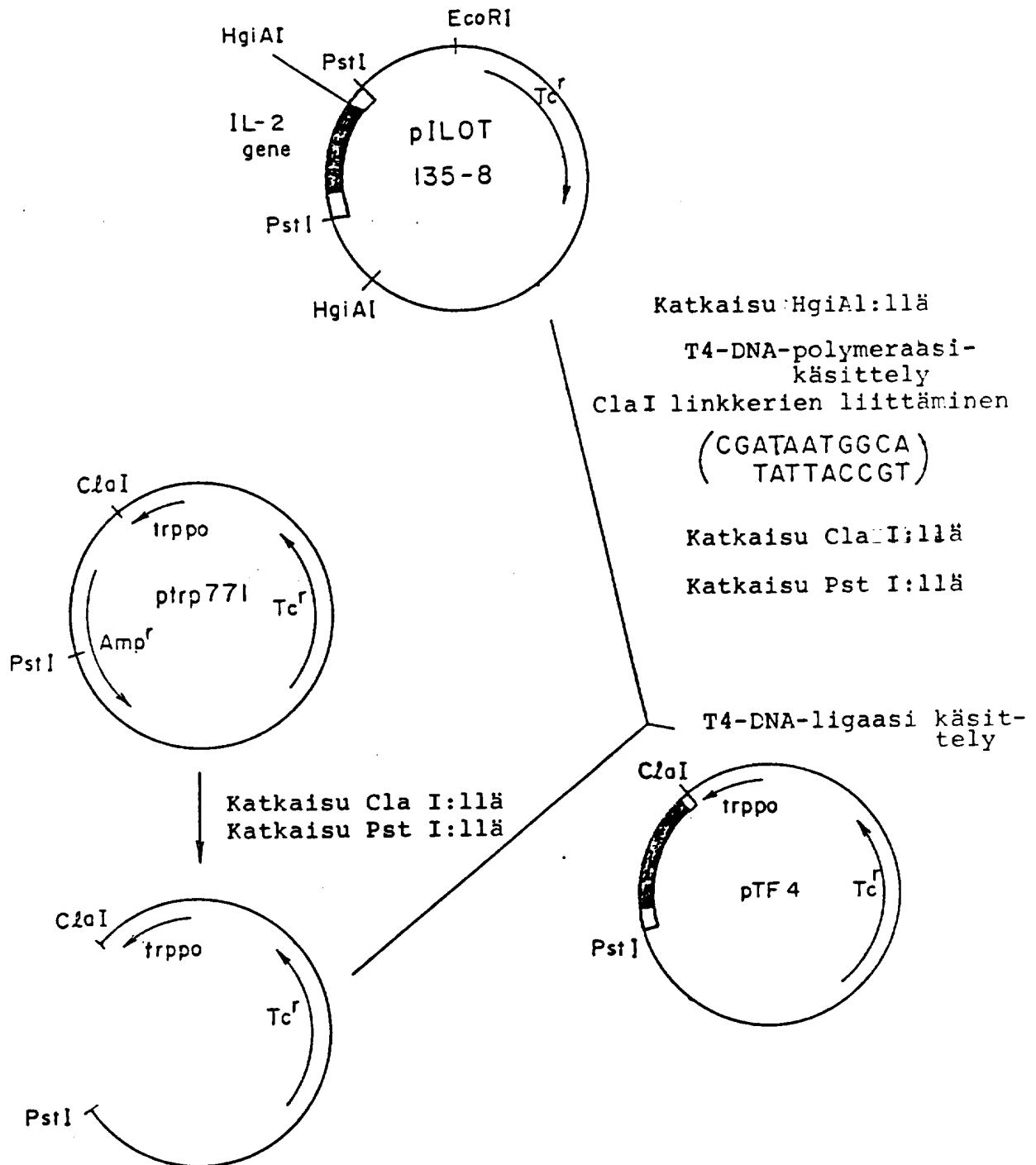
81118

KUVIO 3

1
X-Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln
20
Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn
Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met
40
Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu
60
Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro
Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe
80
His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val
100
Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met
Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe
120
Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser
133
Thr Leu Thr

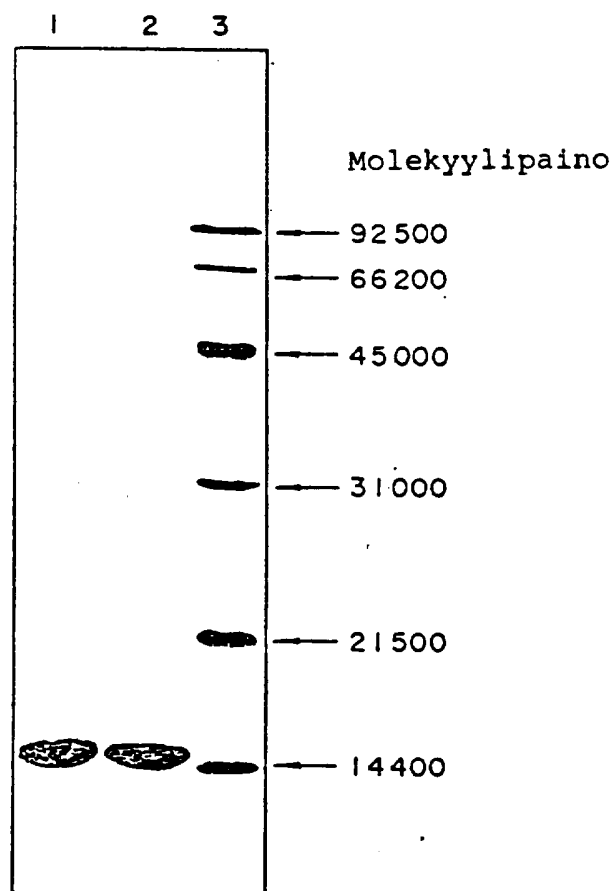
81118

KUVIO 4



81118

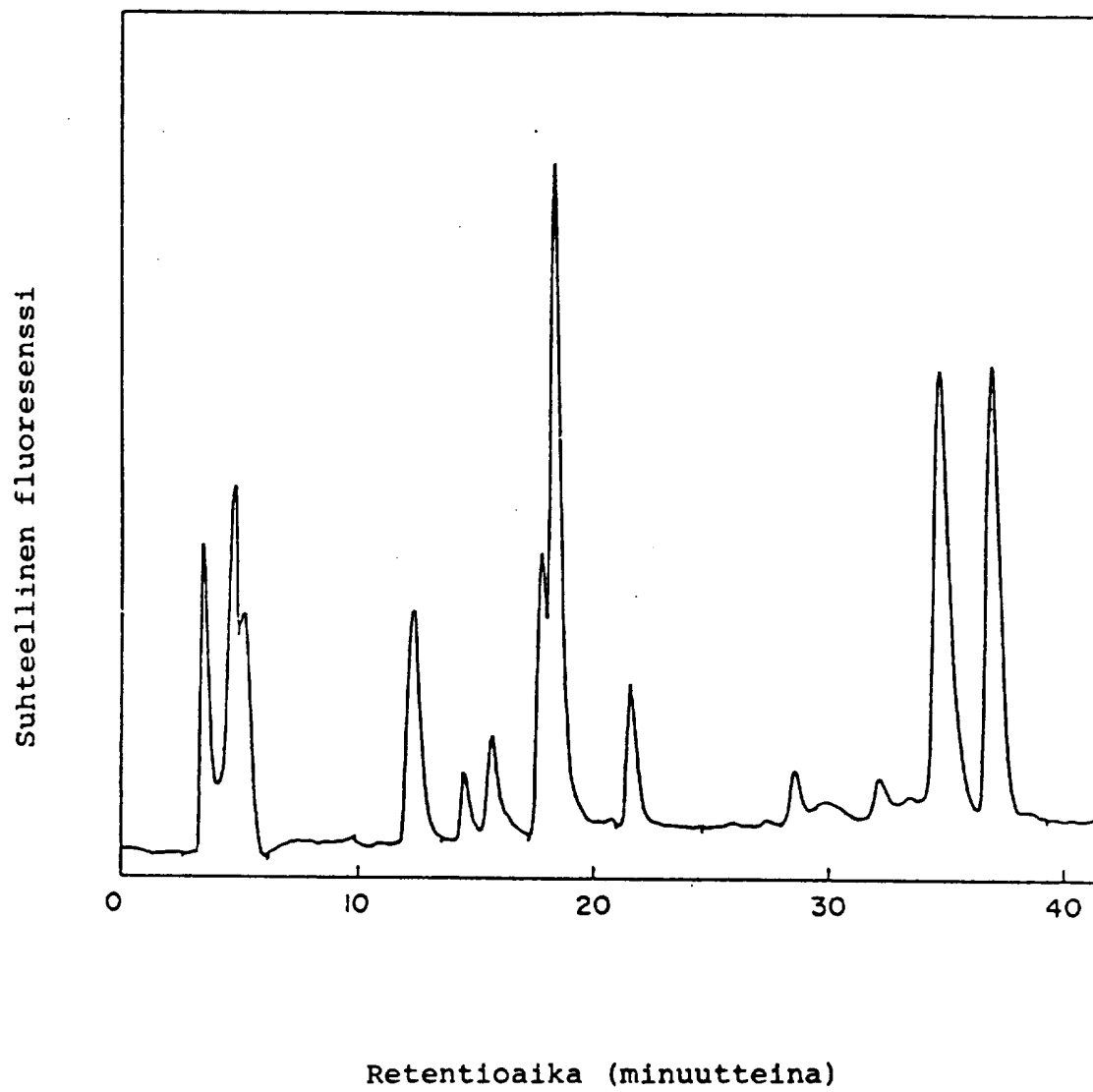
KUVIO 5



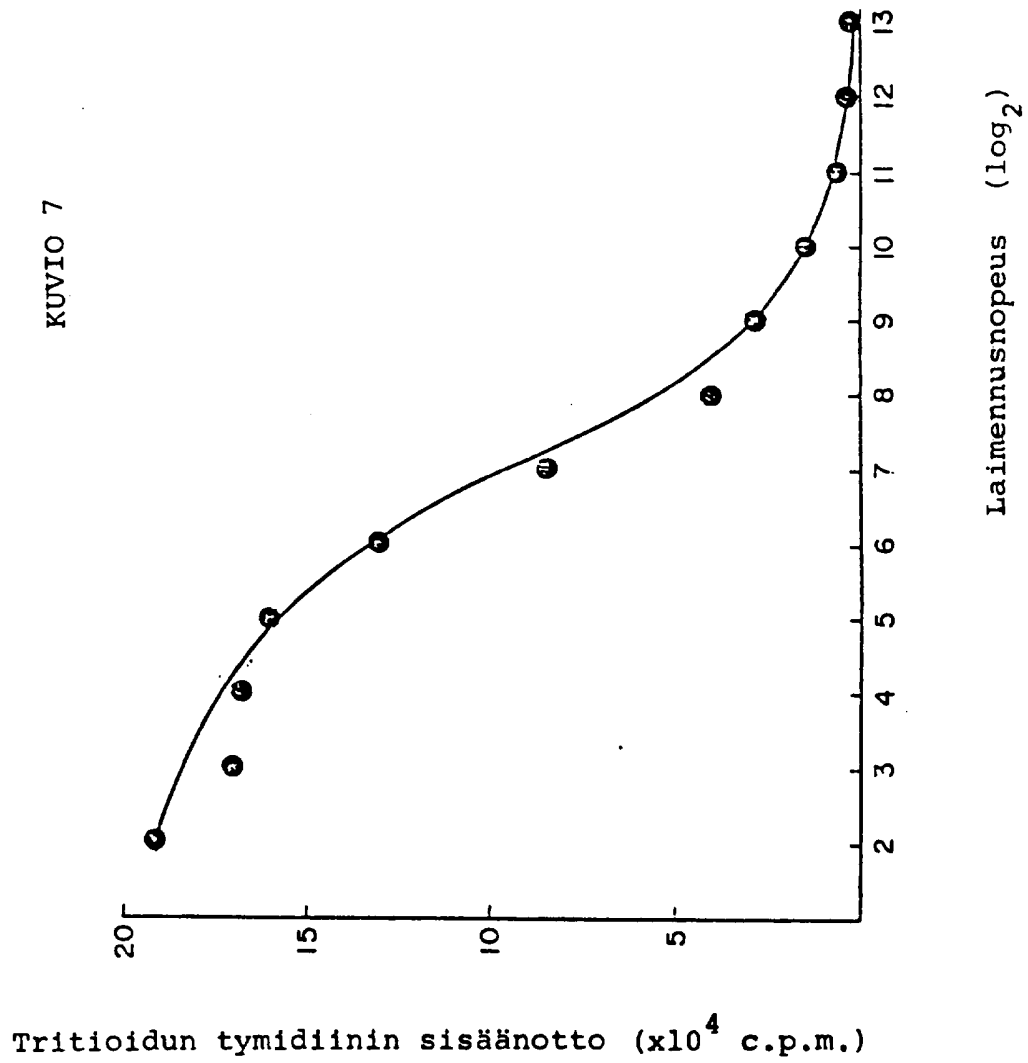
1. Glykosyloimaton ihmisen IL-2-proteiini (ei-pelkistävissä olosuhteissa)
2. Glykosyloimaton ihmisen IL-2-proteiini (pelkistävissä olosuhteissa)
3. Molekyyllipainoa osoittavat merkit

81118

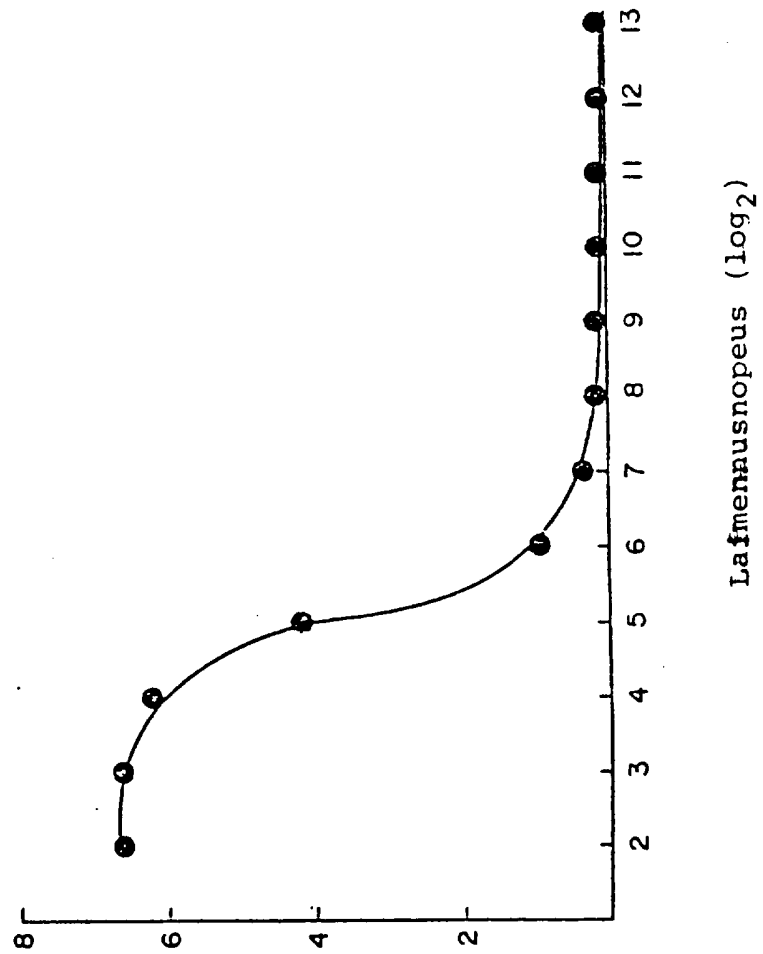
KUVIO 6



KUVIO 7



KUVIO 8



Tritioidun tymidiinin sisäänotto ($\times 10^4$ c.p.m.)

81118

KUVIO 9

