



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **327317**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/72 (2006.01)

C07K 14/54 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/24 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/09 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20000262	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	2000.01.19	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	2000.01.19	(30)	Prioritet	1999.01.20, EP, 99100967
(41)	Alm.tilgj	2000.07.21			
(45)	Meddelt	2009.06.08			
(73)	Innehaver	Bayer Schering Pharma AG LEVERKUSEN, DE			
(72)	Oppfinner	Heiner Apeler, Wuppertal, DE Hermann Wehlmann, Wuppertal, DE			
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO			

(54)	Benevnelse	Vektor for fremstillingen av IL-4 og IL-4-mutanter, DNA-konstruksjon og E.coli.			
(56)	Anførte publikasjoner	PTITSYN LR and ALTMAN IB.Recombinant Escherichia coli strains provide high-level expression of human interleukin-3 and interleukin-4, Bulletin of Experimental Biology and medicine. 1995, Vol.119,side 77-79. US 4689406 A,(BANKS;A.R. et al.)			
(57)	Sammendrag				

Foreliggende oppfinnelse vedrører konstruksjonen og anvendelse av ekspresjonsplasmider i fremstillingen av rekombinant interleukin-4 (IL-4) og interleukin-4-mutanter.

Foreliggende oppfinnelse vedrører vektor for fremstilling av interleukin-4 (IL-4) og IL-4-mutanter i en *Escherichia coli*-stamme samt anvendelse av nevnte vektor i nevnte fremgangsmåte. Oppfinnelsen vedrører videre en DNA konstruksjon samt *Escherichia coli* som er transformert med nevnte vektor eller nevnte DNA-konstruksjon.

5

Moden human interleukin-4 (IL-4) består av 129 aminosyrer med 50% homologi til muse-IL-4. IL-4 er det eneste cytokinet som er kjent å dirigere differensieringen av T-hjelpceller til en T_{H2}-fenotype (Mosmann og Sad, Immunol. Today 17, 138-146, 1996). IL-4-signaliserer på lymfocytter og andre celler gjennom et heterodimerisk kompleks av to cytokinreseptorer, IL-4R α og den vanlige γ -kjeden (γ c). Antagonistiske IL-4-
10 mutanter har blitt beskrevet (Kruse et al., EMBO J. 11, 3237-3244, 1992). Tre aminosyrer nær den C-terminale enden (R121, Y124 og S125) er viktige for binding til γ -kjeden. Introduksjonen av Asp (D) inn i disse posisjonene blokkerer reseptordimerisering og transmembransignalisering.

15

Interleukin-4 dobbeltmutanten (IL-4 DM) er en IL-4-variant med 2 aminosyre-endringer i posisjon 121 og 124, kalt IL-4 R121D Y124D. IL-4 DM er istand til å blokkere både IL-4- og IL-13-aktiviteter. I motsetning til alle enkle setemutanter har ingen residieagonistisk aktivitet noen gang blitt funnet for denne mutanten. Man tror at disse antagonistiske egenskapene til IL-4 DM er nyttige for behandling av sykdommer som involverer
20 T_{H2}-utvikling og/eller IgE-produksjon (Ryan, J. Allergy Clin. Immunol. 99, 1-5, 1997).

Som beskrevet i forskjellige publikasjoner, kan prokaryotiske organismer bli benyttet for å produsere rekombinante IL-4 og IL-4-mutanter. Uheldigvis har de beskrevne systemene mange ulemper (lavt ekspresjonsnivå, lav stabilitet av ekspresjonsvektoren) som
25 gjør storskalaproduksjon av IL-4 og IL-4-mutanter umulig eller økonomisk lite lønnsom.

Foreliggende oppfinnelse skiller seg fra hva som er beskrevet i Bulletin of Experimental
30 Biology and Medicine, vol. 119, nr.1, 1995, side 77-79 ved at det i kravet er definert at vektoren inneholder en T5-promoter. US4689406 vedrører forbedringer av mikrobiell ekspresjon av polypeptider.

Hovedkriteriene for et effektivt og sikkert ekspresjonssystem er:

- høyt produktutbytte
- regulerbar stabil ekspresjon
- 5 • stabilitet av ekspresjonsvektoren

Flere trekk fra et ekspresjonsplasmid er viktig for kriteriene som er nevnt ovenfor (Hanig et al., TIBTECH. 16, 54-60, 1998). Disse er:

- 10 • Promoter
- Ribosomalt bindingssete (rbs)
- Kodonbruk av det korresponderende genet
- Transkripsjonsterminator
- Resistensgen
- 15 • Regulering av ekspresjon
- Start på replikasjon (ori)

Ekspresjonsplasmider for IL-4 og IL-4-mutanter med modifikasjoner i alle de relevante elementene for et effektivt og sikkert ekspresjonssystem, ble fremstilt. Kvaliteten og
20 egnetheten av det korresponderende ekspresjonssystemet ble listet opp hovedsakelig til de følgende kriterier:

- Utbytte av IL-4 og IL-4-mutanter
- Plasmidstabilitet
- 25 • Opprettholdelse av induksjonsevne

Overraskende er det blitt funnet at bakterier transformert med plasmider ifølge foreliggende oppfinnelse gir ekspresjonsrater, plasmid og ekspresjonsstabilitetsverdier mange ganger høyere enn de observert etter transformering av identiske verter med plasmider
30 kjent innen fagfeltet. Derfor er plasmidene ifølge denne oppfinnelsen mye mer nyttige for fremstillingen av rekombinante interleukin-4 og interleukin-4-mutanter enn alle plasmidene som tidligere er kjent.

Det nylig utviklede vektorsystemet inneholder følgende elementer:

T5-promoter

E. coli-fag T5-promoterer sammen med to lac-operatorsekvenser er avledet fra pQE30 plasmid (Qiagen) som tilhører pDS-familien av plasmider (Bujard et al., *Methods Enzymol.* 155, 416-433, 1987 og Stüber et al., *Immunological Methods*, I. Lefkovits og B. Pernis, eds., Academic Press, Inc., vol. IV, 121-152, 1990).

T5 g10-ribosomalt bindingssete

Det ribosomale bindingssetet (rbs) er avledet fra regionen oppstrøms fra gen 10 fra fag T7 (T7 g10 leder). Gen 10 fra fag T7 koder for kappeprotein som er hovedprotein uttrykt etter T7-infeksjon. T7 g10 rbs ble ervervet fra vektoren pET-9a (Studier et al., *Methods Enzymol.* 185, 60-89, 1990). T7 g10 lederen strekker seg over en region på omtrent 100 bp (Olins et al., *Gene* 227-235, 1988). I den endelige ekspresjonskonstruksjonen er regionen oppstrøms for XbaI-setet deletert. T7 g10 ledersekvensen rekker nå over 42 bp og har en baseutbytting fra G til A i posisjon 3638 av det foretrukke plasmid.

Kodonbruk av den naturlige IL-4-sekvensen

Som et effektivt mål på synonym kodonbruksbøylighet, kan kodontilpasningsindeksen (CAI) være nyttig for å predikere nivået av ekspresjon av et gitt gen (Sharp et al., *Nucleic Acids Res.* 15, 1281-1295, 1987 og Apeler et al., *Eur. J. Biochem.* 247- 890-895, 1997). CAI blir beregnet som det geometriske gjennomsnittet av relativ synonym kodonbruk (RSCU) verdier korresponderende til hver av kodonene brukt i ett gen, delt med det maksimalt mulige CAI for et gen av den samme aminosyresammensetningen. RSCU-verdier for hvert kodon blir beregnet fra svært høyt uttrykte gener hos en spesiell organisme, for eksempel *E. coli*, og representerer den observerte frekvensen til et kodon dividert med frekvensen forventet under antagelsen av lik anvendelse av de synonyme kodonene for en aminosyre. Høyt uttrykte gener, for eksempel gener som koder for ribosomale proteiner, har generelt høye CAI-verdier $\geq 0,46$. Dårlig uttrykte gener som lacI og trpR i *E. coli*, har lave CAI-verdier $\leq 0,3$.

Den beregnede *E. coli* CAI-verdien for den naturlige IL-4-sekvensen er 0,733. Dette betyr at det naturlige genet skulle være vel egnet for høynivåekspressjon i *E. coli*. Ikke desto mindre har et syntetisk gen med optimal *E. coli*-kodonbruk (CAI-verdi = 1) potensiale til ytterligere å øke ekspressionsnivået. Derfor ble syntetiske IL-4 og IL-4-mutantgener fremstilt og klonet.

Transkripsjonell terminator

Et T7 DNA-fragment inneholdende transkripsjonsterminatoren T ϕ er avledet fra vektoren pET-9a (Studier et al., Methods Enzymol. 185, 60-89, 1990). Transkripsjonelle terminatorer bestemmer punktene hvor mRNA-RNA-polymerase-DNA-komplekset dissosierer, for derved å avslutte transkripsjon. Tilstedeværelsen av en transkripsjonell terminator på enden av et høyt uttrykt gen, har flere fordeler: De minimaliserer kelatering av RNA-polymerase som kan være engasjert i unødvendig transkripsjon, de begrenser mRNA-lengden til det minimale og begrenser dermed energiutgifter, siden sterk transkripsjon kan interferere med startepunktet for replikasjon, øker en transkripsjonsterminator plasmidstabiliteten på grunn av kopiantalopprettholdelse (Balbas og Bolivar, Methods Enzymol. 185, 14-37, 1990).

Resistensgen

Kan-resistensgenet er avledet fra vektoren pET-9a (Studier et al., Methods Enzymol. 185, 60-89, 1990). Opprinnelig er dette kan-genet av Tn903 fra vektoren pUC4KISS (Barany, Gene 37, 111-123, 1985). I det foretrukkede plasmidet har kan-genet og IL-4 og IL-4-mutantgenet motsatte orienteringer, slik at det ikke skulle være noen økning i kan-genproduktet etter induksjon som skyldes gjennomlesningstranskripsjon fra T5-promoterens. Kanamycin ble valgt som selektiv markør fordi den er det foretrukkede antibiotika for GMP-formål. I tillegg er kan-genbaserte vektorer mer stabile enn ampicillinresistente (bla) plasmider. Ampicillinseleksjon tenderer til å mistes i kulturene siden medikamentet blir degradert ved utskilt β -laktamase-enzymet. Metoden for bakteriell resistens mot kanamycin baserer seg på aminoglykosid-fosfotransferase som inaktiverer antibiotika.

Regulering av ekspresjon

Kontrollert genekspressjon er absolutt nødvendig for å sette opp et stabilt plasmidsystem, spesielt hvis proteinet av interesse er skadelig for vertscellen. Det foretrukke plasmidet bruker et lac-basert induserbart system som består av et lac-repressorgen (*lacI*) og to syntetiske lac-operatorsekvenser satt nedstrøms for *E. coli*-fag T5-promoter. *LacI^d*-promoteren og det *lacI^d*-strukturelle genet ble isolert fra vektoren pTrc99A (Amann et al., *Gene* 69, 301-315, 1988). *I^d* er en promotermutasjon som fører til overproduksjon av *lacI*-repressoren. Villtype-lac-repressor er et tetramerisk molekyl som omfatter fire identiske subenheter på 360 aminosyrer hver. Lac-repressor-tetrameren er en dimer av to funksjonelle dimere. De fire subenhetene blir holdt sammen av en fire-heliks bunt dannet fra residiene 340-360. På grunn av isoleringen av *lacI*-genet fra vektoren pTrc99A ved et *NarI*-kutt, blir residiene etter aminosyre 331 deletert, og 10 aminosyrer som ikke normalt blir kodet for av *lacI*-genet, blir tilsatt. Det er kjent at mutasjoner eller delesjoner kan forekomme i den C-terminale enden av *lacI* etter aminosyre 329, som resulterer i funksjonelle dimere som synes fenotypisk lik villtype-repressoren (Pace et al., *TIBS* 22, 334-339, 1997).

Start av replikasjon (*ori*)

Starten for replikasjon (*ori*) av det foretrukke plasmidet er avledet fra vektoren pET-9a, *ori* som stammer fra pBR322. Det foretrukke plasmidet bærer derfor pMB1 (*ColE1*) replikonet. Plasmider med dette replikonet er multikopi-plasmider som replikerer på en "relaxed" måte. Et minimum på 15-20 kopier av plasmidet blir opprettholdt i hver bakteriecelle under normale vekstbetingelser. Det aktuelle antallet av det foretrukke plasmidet er innen dette området. Replikasjon av *ColE1*-typen *ori*, blir initiert av et 555-nukleotid RNA-transkript, RNA II, som danner et persistent hybrid med dets templat DNA, nær *ori*. RNA II-DNA-hybridet blir deretter kuttet med RNase H ved *ori*, for å gi en fri 3'OH som tjener som en primer for DNA-polymerase I. Denne primingen av DNA-syntese er negativt regulert ved RNA I, et 108-nukleotid RNA-molekyl som er komplementært til 5'enden av RNA II. Interaksjon av antisensen RNA I med RNA II forårsaker en konformasjonsendring i RNA II som inhiberer binding av RNA II til templatet DNA, og derved forhindrer initiering av plasmid DNA-syntese. Bindingen mellom RNA I og II blir forsterket av et lite protein på 63 aminosyrer (*Rop*-proteinet, *Rep*-

ressor for primer), som blir kodet for av et gen lokalisert 400 nukleotider nedstrøms fra starten av replikasjon (Sambrook et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1989). Delesjon av rop-genet fører til en økning i kopianntall, og på grunn av en gendose-effekt som øker ekspresjonsnivåene hos det heterogenet genet som kodes for av plasmidet.

5 Denne observasjonen ble også gjort for IL-4-ekspresjonsvektorene som ble testet. Men det viste seg at rop-plasmider er ustabile og tapes svært raskt under fermenteringen under ikke-selektive betingelser. Derfor inneholder replikonet av det foretrukkede plasmidet rop-genet, for å sikre høy plasmidstabilitet. Det foretrukkede plasmidet mangler mob-genet som kreves for mobilisering, og er derfor istand til å dirigere dens egen konjugale overføring fra én bakterie til en annen.

I det foretrukkede plasmidet ble alle elementene som ikke var nødvendig for plasmid-replikasjonen, resistens og regulerbar ekspresjon, deletert.

15 For å falle inn under området av foreliggende oppfinnelse, behøver ikke alle de ovenfor nevnte trekkene å bli inkorporert i konstruksjonen av det foretrukkede ekspresjonsplasmidet. For eksempel kan et naturlig interleukin-4 eller interleukin-4-mutantgen, bli brukt i stedet for et syntetisk gen, med optimalisert *E. coli*-kodonbruk. Den foretrukkede transkripsjonsterminatoren er T ϕ , men andre terminatorer som *rrnB* T2 eller *aspA* kan
20 også bli brukt.

Metodene som anvendes for å etablere ekspresjonssystemet, er gitt nedenfor.

25

MATERIALER OG METODER

Enzymer

Restriksjonsendonukleaser, kalve-fordøyelse-alkalisk fosfatase, T4 polynukleotidkinase og T4 DNA-ligase ble kjøpt fra Boehringer Mannheim og GIBCO-BRL og brukt som
30 beskrevet av forhandleren.

Rekombinante DNA-metoder

Standard kloningsprosedyrer har blitt beskrevet i Sambrook et al. (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor, 1989). Transformasjoner ble utført ifølge M. Scott (Seed and Aruffo, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3365-3369, 1987). Som verter for transformasjonene ble *E. coli*-stammene DH5 α (GIBCO BRL) og W3110 (ATCC 27325) vanligvis brukt. Genotypen til W3110 er K12, F⁻, [N(rrnD-rrnE)] λ .

Storskala-isoleringer av plasmid DNA ble utført med Qiagen-tips (Qiagen). Ekstraksjon av DNA-fragmenter fra agarosegeler ble utført ved å bruke Jetsorb (Genomed) som anbefalt av forhandleren.

Oligonukleotider for sete-dirigert mutagenese, PCR-reaksjoner og sekvensering, ble ervervet fra MWG Biotech, Pharmacia Biotech eller GIBCO BRL.

Mutagenese-eksperimentene ble utført ved metoden til Deng og Nickoloff (Deng og Nickoloff, Anal. Biochem. 200, 81-88, 1992) ved å bruke "Unique Site Elimination Mutagenesis"-system fra Pharmacia Biotech. Primeren som ble brukt for fremstilling av T7 g10 rbs har den følgende sekvensen:

5'TCAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACATCTAGAAATAATTTTGTTT
AACTTTAAGAA3' (Seq.1).

Alle konstruksjoner og DNA-sekvenser ble bekreftet ved å bruke "Dye Terminator Cycle Sequencing with AmpliTaq DNA Polymerase", FS på en ABI 373A-sekvenseringsmaskin (Applied Biosystems).

Oppfinnelsen blir forklart mer detaljert i de følgende eksemplene, figurene og sekvensinformasjonen:

FIG.1 til FIG. 4: Konstruksjon av det foretrukkede ekspresjonsplasmidet. (Abbreviations: IL-4 TM, IL-4 trippelmutant; IL-4 DM, IL-4 dobbelmutant).

FIG. 5: Plasmidstabilitet til IL-4 mutantekspresjonsvektorene pRO21.1.O og pRO2.1.O. Vektoren pRO2.1.O forblir fullstendig stabil over 78 generasjoner uten antibiotisk seleksjon. I motsetning til ekspresjonsvektoren pRO21.1.O, som er basert på det kommersielt tilgjengelige plasmid pET-30a (Novagen), er tapet svært raskt. Bare 16% av koloniene inneholder plasmidet etter 78 generasjoner uten kanamycinseleksjon.

FIG. 6: Opprettholdelse av induksjon og ekspresjonsevne til den foretrukkede IL-4 og IL-4-mutantekspresjonsvektoren.

EKSEMPLER

Eksempel 1

Plasmidstabilitetstest

Plasmidstabilitetstestene ble alltid startet med en kultur som var frosset i flytende nitrogen. OD₆₀₀ av den tinede kulturen ble bestemt, kulturen fortynnet opptil 10⁻⁴ i PBS-buffer og platet på LB-agarplater uten antibiotika.

1 ml av den tinede kulturen ble inokulert i 100 ml peptonmedium (30 g Soya pepton, 20 g gjærekstrakt, 5 g KH₂PO₄, 20 g Glycerol, 1 g MgSO₄ x 7H₂O pr. liter, pG 7,0) og inkubert ved 37°C med 280 rpm i 24 timer.

OD₆₀₀ til den dyrkede kulturen ble bestemt, kulturen fortynnet opptil 10⁻⁶ i PBS-buffer og platet på LB-agarplater uten antibiotika for å gi godt separerte kolonier.

100 µl fra den dyrkede kulturen ble inokulert i 100 ml peptonmedium og inkubert ved 37°C med 280 rpm i 24 timer. Denne prosedyren ble gjentatt åtte ganger.

100 godt separerte kolonier fra LB-platene ble strøket ut i et gittermønster på LB-plater med kanamycin (25 µg/ml) og LB-plater uten kanamycin og inkubert ved 37°C over natt. Prosentandelen av resistente kolonier ble bestemt hver dag.

Antallet av generasjoner pr. dag ble beregnet ifølge følgende formel: $\log [OD_{600} \text{ END} / OD_{600} \text{ BEG}] / \log 2$.

For ekspresjonsstudier ble 1 ml av en dyrkningskultur fortynnet 100 ganger i LB-medium og behandlet som beskrevet (se eksempel 2).

Eksempel 2

10

Ekspresjon

Ekspresjon for liten skala av interleukin-4 og interleukin-4-mutantceller ble dyrket i LB-medium (10 g Bacto trypton, 5 g gjærekstrakt, 10 g NaCl pr. liter, pH 7,5) inntil OD600 nådde 0,8 – 1,0. Ekspresjon ble induisert ved tilsetning av IPTG til en sluttkonsentrasjon på 0,5 mM og inkuberingen fortsatt i 5 timer. Cellene ble høstet ved sentrifugering.

15

For SDS-PAGE-analyse ble cellepelletene resuspendert i SDS-PAGE ladningsbuffer til en konsentrasjon på 1 OD600 enhet/100 μ l.

20

SEKVENSLISTE

<110> Bayer AG

<120> PLASMIDS, THEIR CONSTRUCTION AND THEIR USE IN THE MANUFACTURE OF INTERLEUKIN-4 AND INTERLEUKIN-4 MUTAINS

5

<130> Plasmids for IL-4 mutains

<140>

<141>

<160> 2

10 <170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 60

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

15 <223> Description of Unknown Organism: primer

<400> 1

tcaattgtga ggggataaca atttcacaca tctagaaata attttgta actttaagaa 60

<210> 2

<211> 4202

<212> DNA

<213> Unknown

20

<220>

<223> Description of Unknown Organism: Human

<400> 2

25 ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 60
 accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagtcca 120
 taggatggca agatcctggt atcgggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180
 tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aaatcacat gagtgcgac 240
 tgaatccggt gagaatggca aaagcctatg catttcttcc cagacttgtt caacaggcca 300
 gccattacgc tegtcatcaa aatcactcgc atcaaccaa cgttattca ttcgtgattg 360
 cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgcgt gttaaaggga caattacaaa caggaatcga 420
 atgcaaccgg cgcaggaaca ctgcccgcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata 480
 ttcttctaata acctggaatg ctgttttccc ggggatcgcga gtggtgagta accatgcatc 540
 atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cgggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 600
 tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 660
 caactctggc gcatcgggct tcccatacaa tcatagatt gtcgacactg attgcccgac 720
 30 attatcgaga gccatttat accatataa atcagcatcc atgttggaa ttaatcggcg 780
 cctcagagcaa gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca cccttggat tactgtttat 840
 gtaagcagac agttttattg ttcatgacca aaatccctta acgtgagttt tctgtccact 900
 gagcgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcccg 960
 taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac cgtaccagc ggtggtttgt ttgccggatc 1020
 aagagctacc aactcttttt ccgaaggtaa ctggcttcag cagagcgcag ataccaata 1080
 ctgtccttct agttagcggc tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta 1140
 catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 1200
 ttaccggggt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg 1260
 ggggttcgtg cacacagccc agcttggagc gaacgacctt caccgaactg agatacctac 1320
 35 agcgtgagct atgagaaagc gccacgcttc ccgaagggag aaaggcggac aggtatccgg 1380
 taagcggcag ggtcggaaaca ggagagcgcga cgagggagct tccaggggga aacgcctggt 1440

ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 60
 accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 120
 taggatggca agatcctggt atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 180
 tattaatttc ccctcgtcaa aaataagggt atcaagttag aaatcaccat gagtgacgac 240
 tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg catttcttc cagacttggt caacaggcca 300
 gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaa cgttattca ttcgtgattg 360
 cgctgagcg agacgaaata cgcgatcgcgt gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 420
 5 atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata tttcacctg aatcaggata 480
 ttcttctaatacctggaatg ctgttttccc ggggatcgc gtggtgagta accatgcatc 540
 atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaaaggc ataaattccg tcagccaagt 600
 tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 660
 caactctggc gcatcgggct tccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgc 720
 attatcgoga gccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggat ttaatcgcg 780
 cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgat tactgtttat 840
 gtaagcagac agttttattg ttcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact 900
 10 gagecgtcaga ccccgtagaa aagatcaaag gatcttcttg agatcctttt tttctgcgog 960
 taatctgctg cttgcaaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggttgt ttgccggatc 1020
 aagagctacc aactctttt ccgaaggtaa ctggetttag cagagcgcag ataccaaaata 1080
 ctgtccttct agttagcgc tagttaggcc accactcaa gaactctgta gcaccgccta 1140
 catacctcgc tctgctaate ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtcgtgtc 1200
 ttaccgggtt ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctg ggctgaacgg 1260
 ggggttcgtg cacacagccc agcttgagc gaacgacct caccgaactg agatacctac 1320
 agcgtgagct atgagaaagc gccacgctc ccgaaggag aaaggcggac aggtatccgg 1380
 15 taagcggcag ggtcggaaca ggagagcgc caagggagct tccaggggga aacgcctggt 1440

P a t e n t k r a v

1.

Vektor for fremstilling av IL-4 og IL-4-mutanter i en *Escherichia coli*-stamme,
5 k a r a k t e r i s e r t v e d at den i 5' til 3' retning omfatter følgende operativt koblede elementer: en regulerbar promoter bestående av *E. coli*-fag T5-promoteren og to lac-operatorsekvenser, et ribosombindingssete fra *E. coli*-fag T7g10, et translasjonsstartkodon, et strukturelt gen for IL-4 eller en IL-4-mutant og én transkripsjonsterminator nedstrøms av det strukturelle genet.

10

2.

DNA-konstruksjon, k a r a k t e r i s e r t v e d at den omfatter DNA sekvensen vist i SEQ. ID. NR 2.

15 3.

Escherichia coli, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert med vektoren ifølge krav 1 eller med DNA-konstruksjonen ifølge krav 2.

4.

20 Anvendelse av vektoren ifølge krav 1 eller DNA-konstruksjonen ifølge krav 2, i en metode for fremstilling av IL-4 og IL-4-mutanter.

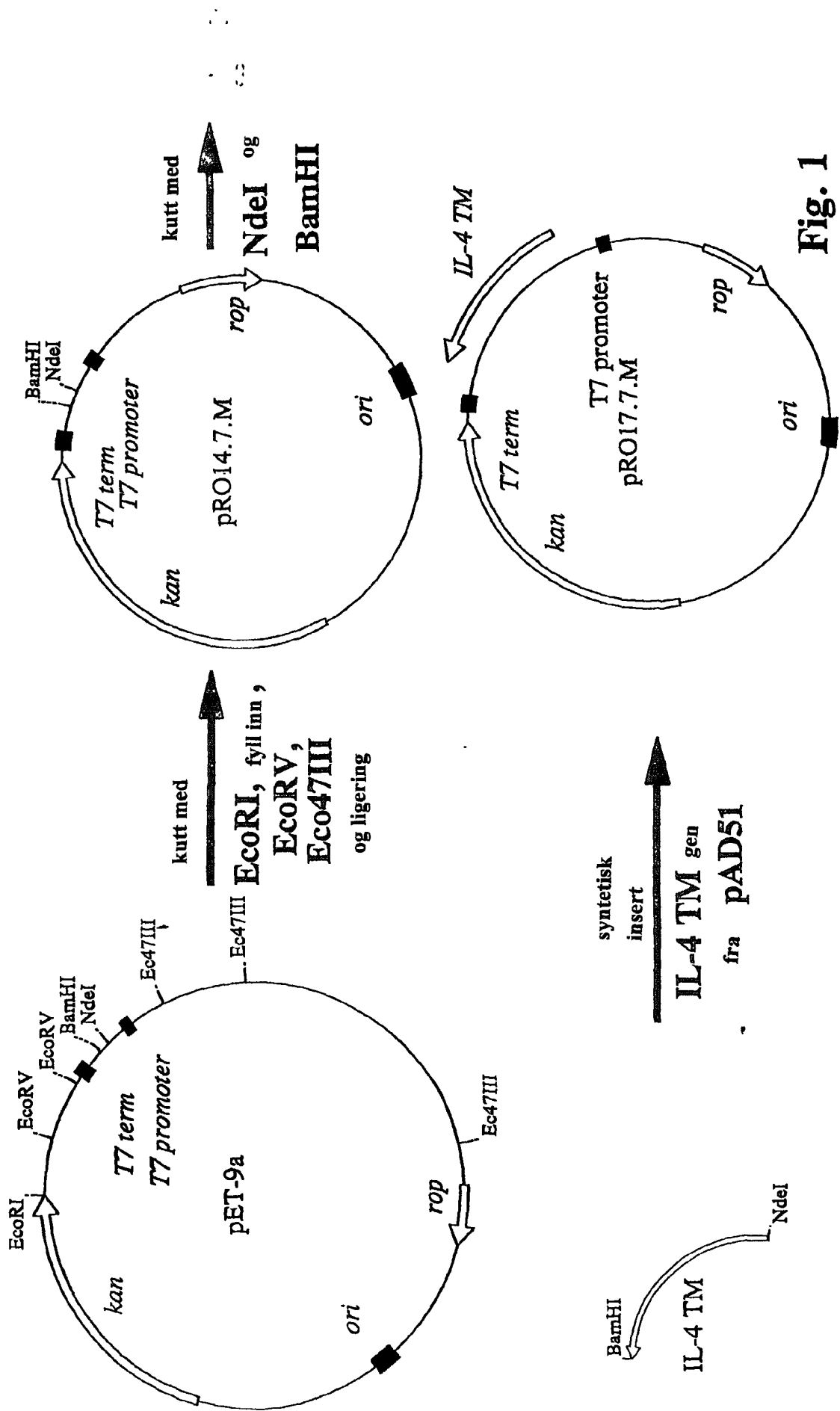


Fig. 1

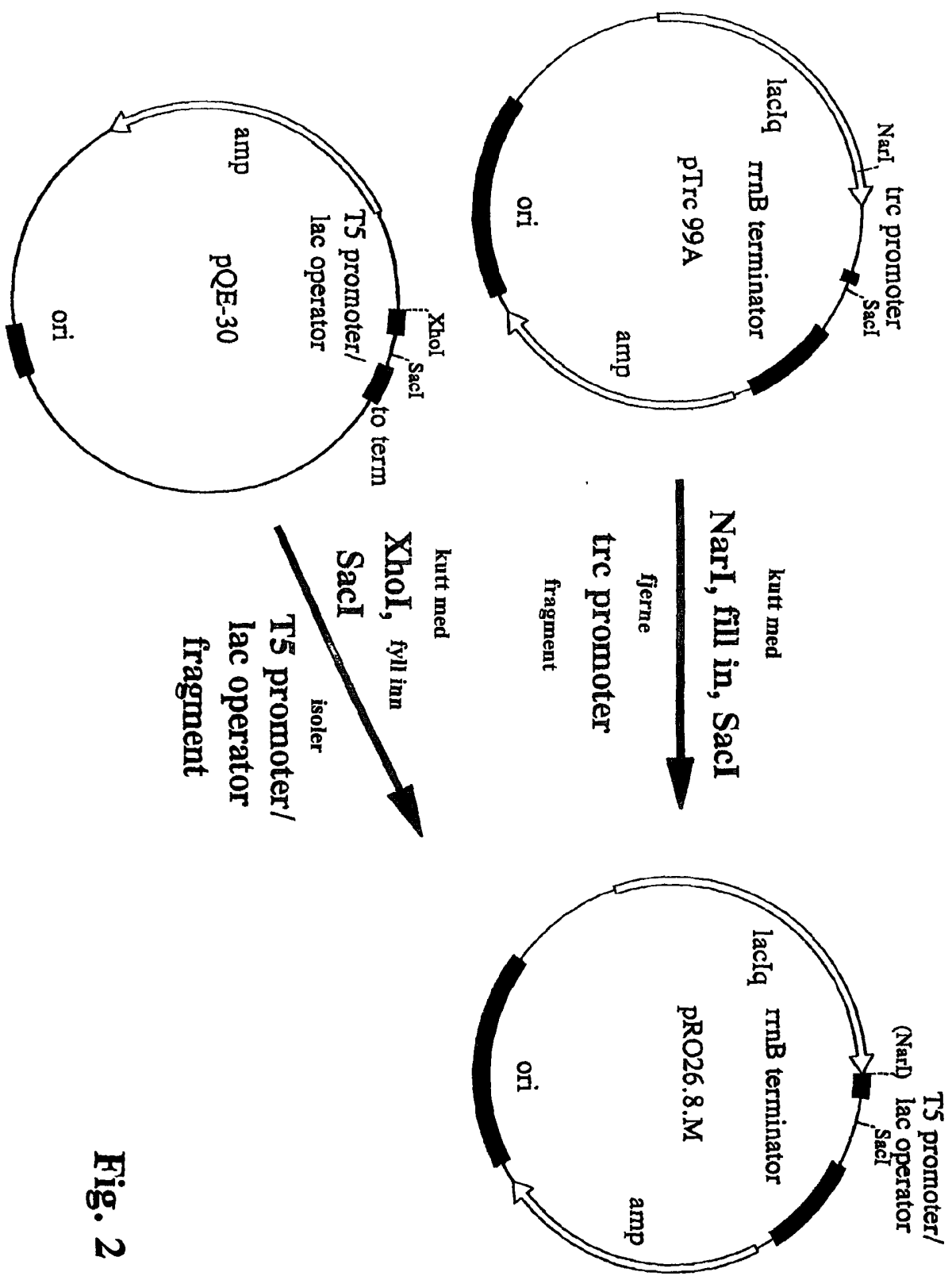


Fig. 2

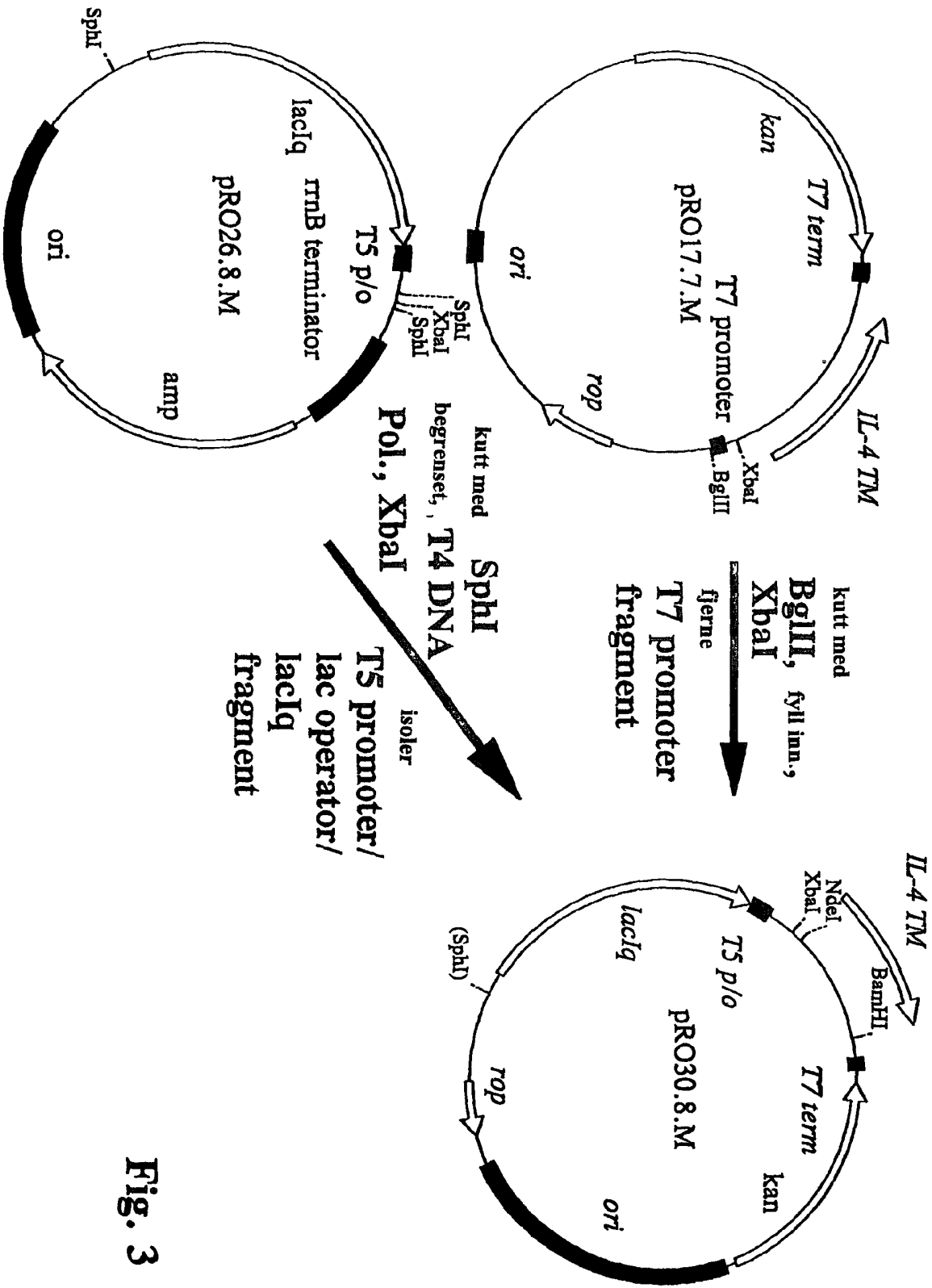
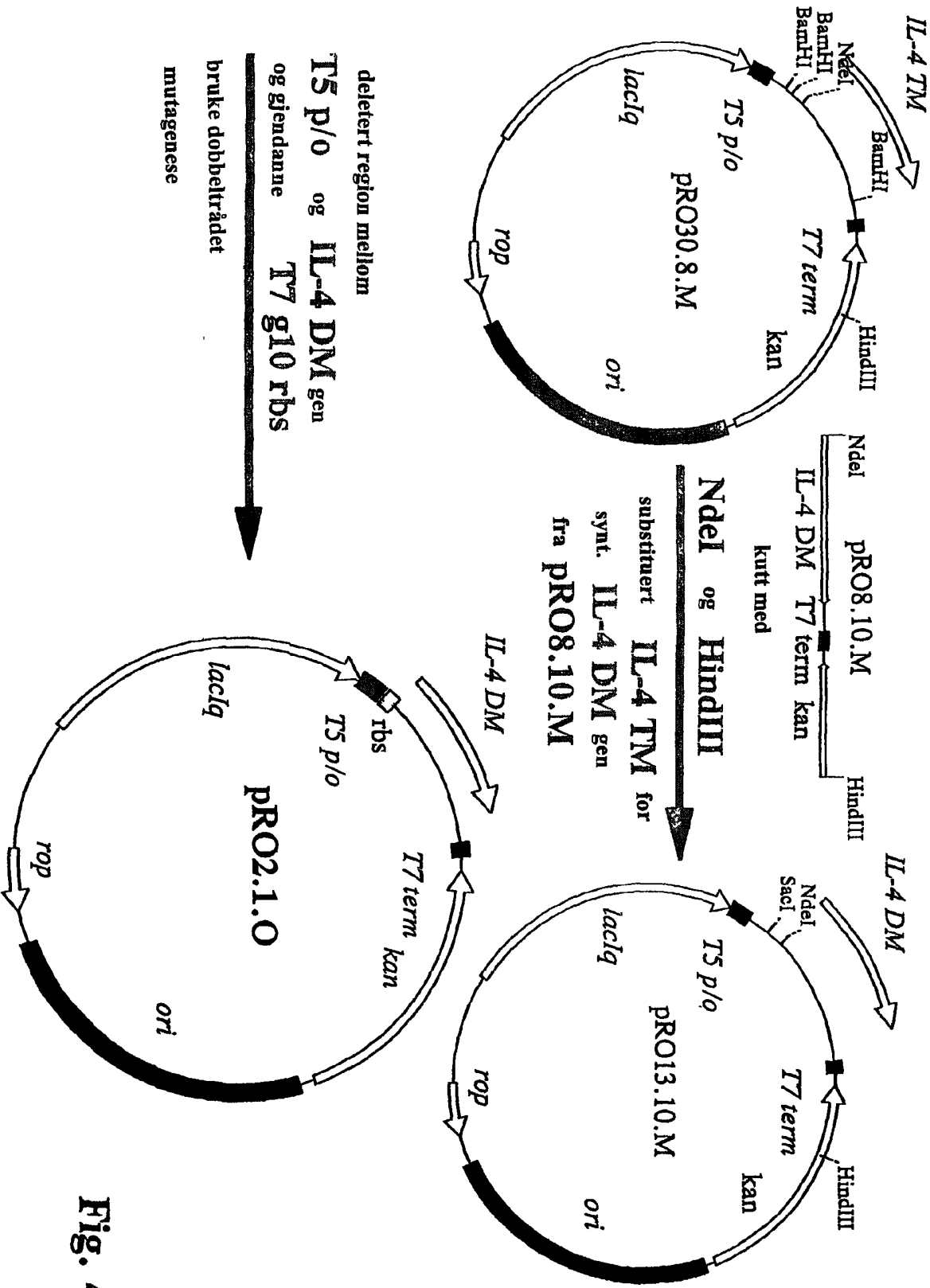


Fig. 3



deletert region mellom
T5 p/o og **IL-4 DM** gen
 og gjendanne **T7 g10 rbs**
 bruke dobbeltrådet
 mutagenese

Fig. 4

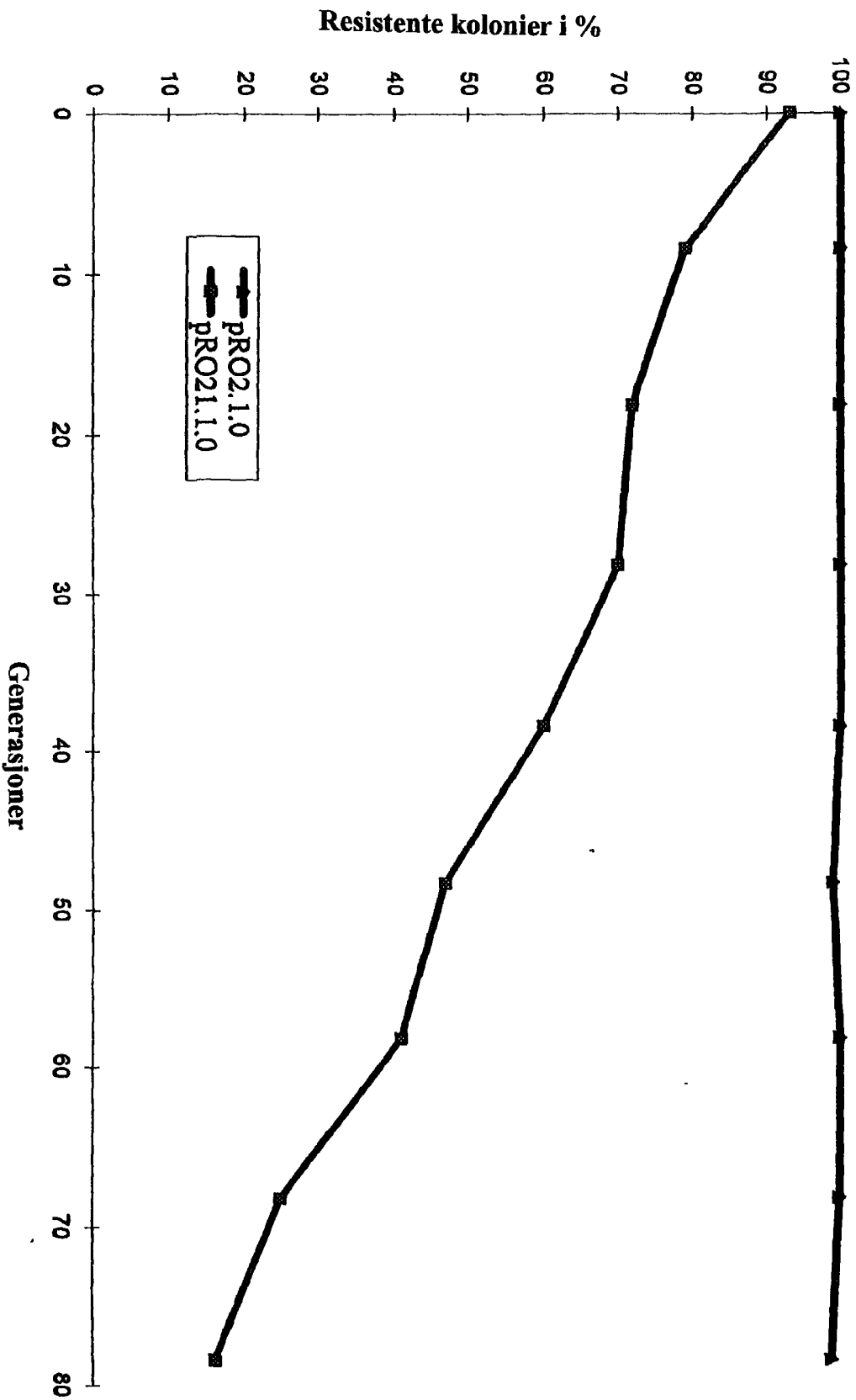
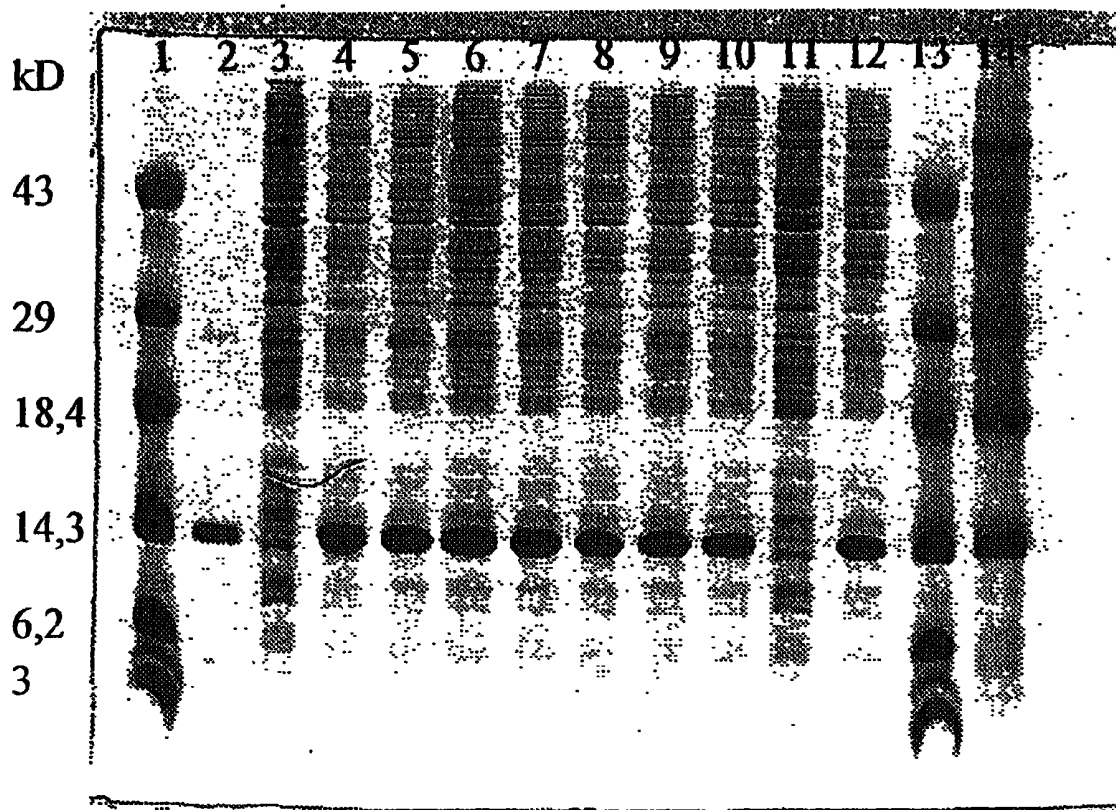


Fig. 5

Fig. 6



SDS-PAGE (15%) analyse av totale ekstrakter fra *E. coli*/pR02.1.O dyrket i forskjellige antall generasjoner uten antibiotisk seleksjon etter 5 timers induksjon med 0,5 mM IPTG. 10 µl av de resuspenderte cellepelletene ble satt på hver brønn. Gelen ble kjørt under reduserende betingelser og farvet med Coomassie briljant-blå.

- Spor 1: Molekylvektmarkør (lavt område, Life Technologies)
- Spor 2: IL-4-mutant (5 µg)
- Spor 3: *E. coli*/pR02.1.O (8 generasjoner) før induksjon
- Spor 4: *E. coli*/pR02.1.O (8 generasjoner) etter induksjon
- Spor 5: *E. coli*/pR02.1.O (18 generasjoner) etter induksjon
- Spor 6: *E. coli*/pR02.1.O (28 generasjoner) etter induksjon
- Spor 7: *E. coli*/pR02.1.O (38 generasjoner) etter induksjon
- Spor 8: *E. coli*/pR02.1.O (48 generasjoner) etter induksjon
- Spor 9: *E. coli*/pR02.1.O (58 generasjoner) etter induksjon
- Spor 10: *E. coli*/pR02.1.O (68 generasjoner) etter induksjon
- Spor 11: *E. coli*/pR02.1.O (78 generasjoner) før induksjon
- Spor 12: *E. coli*/pR02.1.O (78 generasjoner) etter induksjon
- Spor 13: Molekylvektsmarkør (lavt område, Life Technologies)
- Spor 14: Molekylvektsmarkør (høyt område, Life Technologies)