



FI000104188B



SUOMI-FINLAND
(FI)

Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen

(12) **PATENTTIJULKAISU**
PATENTSKRIFT

(10) **FI 104188 B**

(45) Patentti myönnetty - Patent beviljats **30.11.1999**

(51) Kv.lk.6 - Int.kl.6

C 12N 15/12, 15/63, C 12P 21/08

(21) Patenttihakemus - Patentansökning **901124**

(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag **06.03.1990**

(24) Alkuperäisyys - Löpdrag **06.03.1990**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig **08.09.1990**

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet

07.03.1989 EP 89104023 P
20.07.1989 EP 89113310 P

29.05.1989 EP 89109656 P

(73) Haltija - Innehavare

1. **Boehringer Ingelheim International GmbH (BII)**, 6507 Ingelheim am Rhein, Germany, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. **Taniguchi, Tadatsugu**, Mihogaoka 19, A-207, Ibaraki-shi, Osaka 567, Japan, (JP)
2. **Hatakeyama, Masanori**, 21-E-603, Kashikiryama, Suita-shi, Osaka 563, Japan, (JP)
3. **Minamoto, Sejiro**, 1621-1-301, Ohaza-aomada, Minou-shi, Osaka 562, Japan, (JP)
4. **Kono, Takeshi**, 1-8-20-301, Teshimakita, Ikeda-shi, Osaka 563, Japan, (JP)
5. **Doi, Takeshi**, 1-28-6, Hana-koganei-minamimachi, Kodaira-shi, Tokyo 187, Japan, (JP)
6. **Miyasaka, Masayuki**, 636-104, Mimuro, Wrawa-shi, Saitama 336, Japan, (JP)
7. **Tsuda, Mitsuru**, 3-37-1-204, Narimasu, Itabashi-ku, Tokyo 175, Japan, (JP)
8. **Karasuyama, Hajime**, 5-21-38-116, Minami-ooizumi, Nerima-ku, Tokyo 178, Japan, (JP)

(74) Asiamies - Ombud: **Leitzinger Oy**, Ruoholahdenkatu 8, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Rekombinantti interleukiini-2-reseptori
Rekombinant-interleukin-2-reseptor

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism: **FermBP2312 FRI**
FermBP2313 FRI
FermBP2314 FRI
FermBP2315 FRI
FermBP2435 FRI

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

EP A 162699 (C 12N 15/00), WO A 89/00168 (C07K 15/00)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Rekombinantti-IL-21R β -ketju tai sen osat,
niitä koodaava cDNA, tätä cDNA:a sisältä-
vät vektorit, näillä vektoreilla trans-
fektoidut isännät ja monoklonaaliset
vasta-aineet tälle rekombinantti-IL-
2R β :lle tai sen osille.

Rekombinant-IL-21R β -kedja eller delar där-
av, dessa kodande cDNA, detta cDNA innehåll-
ande vektorer, med dessa vektorer transfek-
terade värdar och monoklonala antikroppar
för denna rekombinant-IL-2R β eller dess de-
lar.

Rekombinantti interleukiini-2-reseptori - Rekombinant-interleukin-2-reseptor

Tämän keksinnön kohteena ovat interleukiini-2:n reseptorit, tarkemmin sanoen reseptorin β -ketju, ja β -ketjua tai sen osia koodaava cDNA, β -ketjua koodaavia cDNA-inserttejä sisältävät vektorit, näillä vektoreilla transformoidut isännät ja näiden isäntien viljeleminen mainitun β -ketjun tuottamiseksi.

Siitä, että sytokiinit, eräs luokka liukoisia välittäjäaineita, jotka ottavat osaa solujen välisiin "kommunikointeihin", ovat oleellisia immuunijärjestelmän säätelyssä, on kerääntynyt runsaasti todisteita. Sytokiinien on tiedetty indusoivan kohdesolujen lisääntymistä, erikoistumista ja aktivoitumista vaikuttamalla spesifiseen solupinnan reseptoriin (reseptoreihin). Interleukiini-2 (IL-2), joka aikaisemmin on määritelty T-solun kasvufaktoriksi (1), on eräs parhaiten karakterisoiduista sytakiineista, ja sillä tiedetään olevan ohjaava osuus T-lymfosyyttien (T-solujen) antigeeni-spesifisessä klonaalisisessa lisääntymisessä. IL-2 näyttää myös vaikuttavan muihin immuunijärjestelmän soluihin, kuten kypsyttymiin tymosyytteihin (3), B-lymfosyytteihin (B-solut) (4), makrofaageihin (5), luonnon tappajasoluihin (NK-solut), (6) ja lymfokiinin aktivoimiin tappajasoluihin (LAK-soluihin) (7). Nämä IL-2:n monifunktionaaliset ominaisuudet ovat nyt avanneet mahdollisuuksia immunoterapioiden, kuten adoptiivisen immunoterapian (8) formuloimiseen. IL-2:n on äskettäin osoitettu vaikuttavan myös hermosoluihin, kuten oligodendrosyytteihin (9), mikä viittaa tämän sytokiinin mahdolliseen osallistumiseen keskushermostojärjestelmään. Huolimatta perus- ja kliinisen immunologian yhteydessä tehdyistä laajoista IL-2-systeemin tutkimuksista, informaatio on rajoittunut IL-2:n välittämän signaalitransduktion pohjana olevaan molekyylimekanismiin (-mekanismeihin).

IL-2-reseptorin (IL 2R) on tiedetty olevan ainutlaatuinen siinä suhteessa, että se esiintyy kolmessa muodossa: IL-2:aan sitoutumiskyvyltään korkea-, keski- ja matala-affiniteettisissä muodoissa vastaavien dissosiaatiovakioiden (K_d -arvot) ollessa $10^{-11}M$, $10^{-9}M$ ja $10^{-8}M$ (11, 12). IL-2R α -ketjun (Tac-antigeeni, p55) karakterisoinnin jälkeen (13) kävi ilmeiseksi, että α -ketju muodostaa yksinomaan matala-affiniteettisen muodon ja että se ei ole sinänsä funktionaa-

- linen IL-2:n sisäistämisessä ja signaalin transduktiossa, ellei se liity lymfoidi-solujen toiseen spesifiseen membraanikomponenttiin (-komponentteihin) (14, 15). Lymfoidimembraanikomponentti tunnistettiin myöhemmin uudeksi reseptoriketjuksi, jolle annettiin nimeksi β -ketju (tai p70-75) (12, 16, 17). Itse
- 5 asiassa kokeelliset todisteet ovat viitanneet siihen, että IL-2R β -ketju sinänsä muodostaa keskiaffiniteettisen muodon (12). Lisäksi sen liittyminen IL-2R α -ketjuun johtaa reseptorin korkea-affiniteettiseen muotoon (12, 16, 17). Eks-
- pressoititutkimukset, joissa on käytetty villityypin ja mutatoitua IL-2R α -ketjun cDNA-molekyyliä, tukevat voimakkaasti käsitystä, että IL-2R β -ketjussa, mutta
- 10 ei IL-2R α -ketjussa, on alue (alueita), joka käyttää signaalin transduktion solun-sisäistä reittiä (reittejä) (18). Sen vuoksi on olemassa tarve saada IL-2 β -ketjua niin paljon, että voidaan selvittää sen rakenne ja toiminta. Tämä on oleellinen vaihe haluttaessa ymmärtää paremmin korkea-affiniteettisen IL-2R:n molekyyli-taustaa sekä IL-2:lle reaktiivisissa soluissa toimivan signaalitransduktion
- 15 mekanismia. Tätä tarkoitusta varten kuvaamme jäljempänä IL-2R β -ketjua tai sen osia koodaavan cDNA:n, jolloin insertoimalla tämä cDNA sopivaan vekto-riin ja ekspressoimalla se sopivassa isännässä voidaan rekombinanttitekniikal-la ja suuressa mitassa tuottaa IL-2R β -ketjua tai sen osia vastaavaa proteiinia.
- 20 Esillä oleva keksintö tuo siten esiin IL-2R β -ketjua tai sen osaa koodaavan rekombinantti-cDNA:n.

Keksinnön mukaisella cDNA:lla voi olla kaava:

GCG GCC CCT GCT CTG TCC TGG CGT CTG CCC CTC CTC ATG
 CTC CTC CTG CCC CTG GCT ACC TCT TGG GCA TCT GCA GCG
 GTG AAT GGC ACT TCC CAG TTC AGA TGC TTC TAC AAC TCG
 5 AGA GCC AAC ATC TCC TGT CTC TGG AGC CAA GAT GGG GCT
 CTG CAG GAC ACT TCC TGC CAA GTC CAT GCC TGG CCG GAC
 AGA CGG CGG TGG AAC CAA ACC TGT GAG CTG CTC CCC GTG
 AGT CAA GCA TCC TGG GCC TGC AAC CTG ATC CTC GGA GCC
 CCA GAT TCT CAG AAA CTG ACC ACA GTT GAC ATC GTC ACC
 10 CTG AGG GTG CTG TGC CGT GAG GGG GTG CGA TGG AGG GTG
 ATG GCC ATC CAG GAC TTC AAG CCC TTT GAG AAC CTT CGC
 CTG ATG GCC CCC ATC TCC CTC CAA GTT GTC CAC GTG GAG
 ACC CAC AGA TGG AAC ATA AGC TGG GAA ATC TCC CAA GCC
 TCC CAC TAC TTT GAA AGA CAC CTG GAG TTC GAG GCC CGG
 15 ACG CTG TCC CCA GGC CAC ACC TGG GAG GAG GCC CCC CTG
 CTG ACT CTC AAG CAG AAG CAG GAA TGG ATC TGC CTG GAG
 ACG CTC ACC CCA GAC ACC CAG TAT GAG TTT CAG GTG CGG
 GTC AAG CCT CTG CAA GGC GAG TTC ACG ACC TGG AGC CCC
 TGG AGC CAG CCC CTG GCC TTC AGG ACA AAG CCT GCA GCC
 20 CTT GGG AAG GAC ACC ATT CCG TGG CTC GGC CAC CTC CTC
 GTG GGC CTC AGC GGG GCT TTT GGC TTC ATC ATC TTA GTG
 TAC TTG CTG ATC AAC TGC AGG AAC ACC GGG CCA TGG CTG
 AAG AAG CTC CTG AAG TGT AAC ACC CCA GAC CCC TCG AAG
 TTC TTT TCC CAG CTG AGC TCA GAG CAT GGA GGA GAC GTC
 25 CAG AAG TGG CTC TCT TCG CCC TTC CCC TGA TCG TCC TTC
 AGC CCT GGC GGC CTG GCA CCT GAG ATC TCG CCA CTA GAA
 GTG CTG GAG AGG GAC AAG GTG ACG CAG CTG CTC CTG CAG
 CAG GAC AAG GTG CCT GAG CCC GCA TCC TTA AGC AGC AAC
 CAC TCG CTG ACC AGC TGC TTC ACC AAC CAG GGT TAC TTC
 30 TTC TTC CAC CTC CCG GAT GCC TTG GAG ATA GAG GCC TGC
 CAG GTG TAC TTT ACT TAC GAC CCC TAC TCA GAG GAA GAC
 CCT GAT GAG GGT GTG GCC GGG GCA CCC ACA GGG TCT TCC
 CCC CAA CCC CAT CAG CCT CTG TCA GGG GAG GAC GAC GCC
 TAC TGC ACC TTC CCC TCC AGG GAT GAC CTG CTG CTC TTC
 35 TCC CCC AGT CTC CTC GGT GGC CCC AGC CCC CCA AGC ACT
 .. GCC CCT GGG GGC AGT GGG GCC GGT GAA GAG AGG ATG CCC

CCT TCT TTG CAA GAA AGA GTC CCC AGA GAC TGG GAC CCC
CAG CCC CTG GGG CCT CCC ACC CCA GGA GTC CCA GAC CTG
GTG GAT TTT CAG CCA CCC CCT GCG CTG GTG CTG CGA GAG
GCT GGG GAG GAG GTC CCT GAC GCT GGC CCC AGG GAG GGA
5 GTC AGT TTC CCC TGG TCC AGG CCT CCT GGG CAG GGG GAG
TTC AGG GCC CTT AAT GCT CGC CTG CCC CTG AAC ACT GAT
GCC TAC TTG TCC CTC CAA GAA CTC CAG GGT CAG GAC CCA
ATC CAC TTG GTG TAG

- 10 joka koodaa ihmisen IL-2R β :a tai sen johdettua muunnosta tai sen osaa.

Toisella keksinnön mukaisella cDNA:lla on esimerkiksi kaava:

GCT ACC ATA GCT CTT CCC TGG AGC CTG TCC CTC TAC GTC TTC CTC CTG CTG CTC CTG GCT ACA CCT TGG GCA TCT GCA
 GCA GTG AAA AAC TGT TCC CAT CTT GAA TGC TTA TAC AAC TCA AGA GTC TTA TAC AAC TCA AGA GTC TTA TAC AAC TCA AGA
 GAG GCT CTG AAT GTC ACA ACC TGC CAC GTC CAT GCC AAG TCG AAC CTG CGA CAC TGG AAC AAA ACC TGT GAG CTA
 ACT CTT GTG AGG CAG GCA TCC TGG GCC TGC AAC CTG ATC CTC GGG TCG TTC CCA GAG TCC CAG TCA CTG ACC TCC
 GTG GAC CTC CTT GAC ATA AAT GTG GTG TGC TGG GAA GAG AAG GGT TGG CGT AGG GTA AAG ACC TGC GAC TTC CAT
 CCC TTT GAC AAC CTT CGC CTG GTG GCC CCT CAT TCC CTC CAA GTT CTG CAC ATT GAT ACC CAG AGA TGT AAC ATA
 AGC TGG AAG GTC TCC CAG GTC TCT CAC TAC ATT GAA CCA TAC TTG GAA TTT GAG GCC CGT AGA CGT CTT CTG GGC
 CAC AGC TGG GAG GAT GCA TCC GTA TTA AGC CTC AAG CAG AGA CAG ACG TGG CTC TTC TTG GAG ATG CTG ATC CCT
 AGT ACC TCA TAT GAG GTC CAG GTG AGG GTC AAA GCT CAA CGA AAC AAT ACC GGG ACC TGG AGT CCC TGG AGC CAG
 CCC CTG ACC TTT CGG ACA AGG CCA GCA GAT CCC ATG AAG GAG ATC CTC CCC ATG TCA TGG CTC AGA TAC CTT CTG
 CTG GTC CTT GGT TGT TCT GGC TTC TTC TCC TGC GTC TAC ATT TTG GTC AAG XXX CGG TAC CTT GGG CCA TGG
 CTG AAG ACA GTT CTC AAG TGC CAC ATC CCA GAT CCT TCT TCT GAG TTC TTC TCC CAG CTG AGC TCC CAG CAT GGG GGA
 GAC CTT CAG AAA TGG CTC TCC TCG CCT GTC CCC TGG TCC TTC TGC AGC CCC AGT GGC CCT GGC CCT GAG ATC TCT
 CCG CTG GAA GTG CTC GAC GGA GAT TCC AAG GCC GTG CAG CTG CTC CTG TTA CAG AAG GAC TCT GGC CCT TTA CCC
 TCG CCC AGC GGC CAC TCA CAG GCC AGC TGC TTC ACC AAC CAG GGC TAC TTC TTC CAT CTG CCC AAT GCC TTG
 GAG ATC GAA TCC TGC CAG GTG TAC TTC ACC TAT GAC CCC TGT GTG GAA GAG GAG GTG GAG GAT GGG TCA AGG
 CTG CCC GAG GGA TCT CCC CAC CCA CCT CTG CTG CCT GCT GGA GAA CAG GAT GAC TAC TGT GCC TTC CCG CCC
 AGG GAT GAC CTG CTG TTC TCC CCG AGC CTC AGC ACC CCC AAC ACT GCC TAT GGG GGC AGC AGA GCC CCT GAA
 GAA AGA TCT CCA CTC TCC CTG CAT GAG GGA CTT CCC TCC CTA GCA TCC CGT GAC CTG ATC GGC TTA CAG CGC CCT
 CTG GAG CGG ATG CCG GAA GGT GAT GGA GAG GGG CTG TCT GCC AAT AGC TCT GGG GAG CAG GCC AGT GTC CCA GAA
 GGC AAC CTT CAT GGG CAA GAT CAG GAC AGA GGC CAG GGC CCC ATC CTG ACC CTG AAC ACC GAT GCC TAT CTG TCT
 CTT CAA GAA CTA CAG GGC CAA GAT TCA GTC CAC CTA ATA TAG ***

XXX = GGC tai TGC

joka koodaa hiiren IL-2R β :a tai sen johdettua muunnosta tai sen osaa.

- Esillä olevassa keksinnössä erityisen mielenkiintoisia DNA-molekyyliä ovat ne, jotka koodaavat IL-2R β :n osia, esimerkiksi solunulkoista osaa tai sen osaa
5 tai solunsisäistä osaa tai sen osaa.

Erityisen mielenkiintoisia ovat ne DNA:t, jotka koodaavat IL2-R β :n liukoisia osia, näihin mukaanlukien solunulkoisia osia ja niiden osia.

- 10 Esillä olevan keksinnön piiriin sisältyy siten myös cDNA, joka koodaa edellä mainittujen cDNA-molekyylien osia, esimerkiksi hIL-2R β -ketjun täydellisen sekvenssin osia, esimerkiksi solunulkoista osaa alkaen aminohapossa (tai lähellä sitä) (a,a) (kts. kuvio 1 B) 1 esimerkiksi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ja päättyen aminohapossa (tai sen läheisyydessä) 214 esimerkiksi 200, 201, 202,
15 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, tai tämän solunulkoisen osan alaosia tai sen johdettuja muunnoksia tai reseptoriketjun solunsisäistä osaa vastaavia osia, esimerkiksi osaa alkaen aminohapossa (tai lähellä sitä) 239 esimerkiksi a.a. 230, 231, 232, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242 aminohappoon 525 asti (tai lähelle sitä),
20 esimerkiksi 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524 ja 525, tai sen alaosia tai sen johdettuja muunnoksia, sekä cDNA, joka koodaa hiiren IL-2R β -ketjun (kts. kuvio 8) täydellisen sekvenssin osia, esimerkiksi solunulkoista osaa alkaen aminohapossa (tai lähellä sitä) 1, esimerkiksi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ja päättyen aminohappoon 210 (tai lähelle sitä), esimerkiksi 200, 201, 202, 203,
25 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220 tai tämän solunulkoisen osan alaosia tai sen johdettuja muunnoksia, tai reseptoriketjun solunsisäistä osaa vastaavia osia, esimerkiksi osaa, joka alkaa aminohapossa (tai lähellä sitä) 235, esimerkiksi aminohappo 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241,
30 242 aminohappoon 513 asti (tai lähelle sitä), esimerkiksi 505, 506, 507, 508, 509, 510, 512 ja 513, tai sen alaosia tai sen johdettuja muunnoksia.

- Huomattakoon, että tässä kuvatuille nimenomaisille IL-2R β -ketjuille tai niiden osille voi olla olemassa luonnonmukaisia alleelimuunnoksia yksittäisestä tapauksesta riippuen. Nämä variaatiot voivat käydä ilmi yhden tai useamman aminohapon erona koko sekvenssissä tai yhden tai useamman aminohapon deleetioina, substituutioina, insertioina, inversioina tai lisäyksinä sekvenssissä.
- Lisäksi on huomattava, että tässä kuvattu IL-2R β -ketju tai sen osat voivat olla modifioituja geenitekniikan avulla, esimerkiksi pistemutatoimalla, substituotimalla, deletioimalla tai lisäämällä yksi tai useampi aminohappo muuttamatta IL-2R β -ketjun tai sen osan oleellisia ominaisuuksia. Esillä olevan keksinnön piiriin sisältyvät siten myös DNA-sekvenssit, jotka kykenevät hybridisoitumaan tässä yhteydessä kuvattujen DNA-sekvenssien kanssa, ja jotka koodaavat proteiineja, joilla on oleellisesti IL-2R β -ketjun tai sen osien, erityisesti liukoisen IL-2R β :n aktiivisuus.
- Keksinnön eräänä tavoitteena on edelleen tuoda esiin rekombinantti-DNA-molekyyli, joka koodaa ihmisen IL-2R β :n vesiliukoista osaa (hIL2-R β), esimerkiksi aminohapposekvenssiä, joka käsittää koko hIL2-R β :n aminohapot noin 1 - noin 210. Tällainen DNA-molekyyli voi koodata esimerkiksi liukoista ihmisen interleukiini-2-reseptorin β -ketjujohdosta, jossa on 212 aminohapporyhmää, joista ryhmät 1 - 210 vastaavat luonnon IL-2R β -ketjun aminohappoja.

Esimerkiksi eräässä jäljempänä kuvatussa suoritusmuodossa ovat liukoista hIL-2R β -johdannaisista koodaavat cDNA-molekyylin terminaaliset nukleotidit seuraavia:

25

```

GCC CTT GCT AGC TAG
208 Ala  Leu  Ala  Ser  [Stop]

```

30

Rekombinantti-DNA-teknologian vakiomenetelmiä käyttämällä voidaan sopivien isäntäsolujen transformoimista varten rakentaa vektoreita, jotka sisältävät cDNA-sekvenssejä, jotka vastaavat edellä esitetyn IL-2R β :n tai minkä tahansa sen halutun osan tai sen johdetun muunnoksen rakennegeeniä.

Sopivia vektoreita ovat esimerkiksi plasmidivektorit, ja ne sisältävät kontrolli- ja säätelysekvenssejä, jotka on operatiivisesti kytketty IL-2R β -ketjua tai sen osaa koodaavaan cDNA-sekvenssiin.

- 5 Sopivat tekniikat ovat yleisesti tunnettuja ja laajalti käytettyjä, ja niitä on kuvattu esimerkkimäisesti muiden proteiinien yhteydessä eurooppalaisissa patenttijulkaisuissa, julkaisunumerot 0254249 ja 01700204.

- 10 Halutun proteiinin saaminen puhtaassa muodossa viljelmästä voidaan suorittaa standarditekniikoilla, ja tällaisesta proteiinista saadaan sopiva antigeeni monoklonaalisten vasta-aineiden valmistamista varten. Siten hybridomeja, jotka kykenevät erittämään monoklonaalista vasta-ainetta, jolla on spesifinen affiniteetti IL-2R β -ketjuun tai sen haluttuun osaan, voidaan valmistaa immuno-
- 15 pernasolut ei-immunoglobuliinia erittävien myeloomasolujen kanssa ja valitsemalla saaduista hybridomeista solulinja, joka tuottaa sitoutumisspesifisyydeltään halutunlaista monoklonaalista vasta-ainetta, ja haluttaessa sen jälkeen alikloonaamalla tällainen hybridoma.

- 20 Tekniikat, joilla valmistetaan hybridomia ja joilla näistä saadaan monoklonaalisia vasta-aineita puhtaassa muodossa, ovat yleisesti tunnettuja, ja niitä on esimerkkimäisesti kuvattu eurooppalaisessa patenttihakemuksessa, julkaisunumero 0168745.

- 25 Keksinnön mukaiset vasta-aineet ovat hyödyllisiä esimerkiksi diagnostisissa tarkoituksissa ja myös immuunisuppression tai -aktivoinnin avulla tapahtuvassa hoidossa. Edellä on jo mainittu, että tällaisia vasta-aineita voitaisiin muodostaa käyttämällä puhdistettua rekombinanttiproteiinia keksinnön mukaisesti tai transfektoimalla keksinnön mukainen cDNA, ottamalla talteen reseptoria suuria
- 30 määriä ekspressoivia soluja ja käyttämällä tällaisia soluja vasta-aineiden valmistamiseen.

Edellä jo todettiin, että esillä oleva keksintö käsittää IL-2R β -ketjun liukoiset muodot ja liukoisen IL-2-reseptorin. Liukoisiin muotoihin sisältyvät ne muodot, joita koodaavat cDNA-sekvenssit, jotka koodaavat IL-2R β :n solunulkoista osaa tai sen alaosia, kuten edellä on kuvattu. Haluttaessa voidaan tuottaa samanai-
5 kaisesti sekä IL-2R β -ketju että α -ketju.

IL-2 β -ketjun alaosille spesifisten monoklonaalisten vasta-aineiden saatavuus mahdollistaa reseptoriketjun epitooppien tunnistamisen. Tämä avaa siten tien reseptorin aktiivisuuden kontrolloimiseen käyttämällä sopivia monoklonaalisia
10 vasta-aineita tai muita peptidejä tai peptidomimeettisiä aineita tai proteiiniana-
logeja.

Ihmisen IL-2R β -ketjua koodaavien cDNA-kloonien eristäminen ja analysointi

15 cDNA-kloonien eristämisessä sovellettiin ekspressoitukloonausstrategiaa käyttämällä monoklonaalisia Mik- β 1- ja Mik- β 2-vasta-aineita (19). Molemmat näistä on kehitetty ihmisen leukemiasolulinjan YT IL-2R β -ketjua vastaan (20).

Kummankin monoklonaalisen vasta-aineen Mik- β 1 ja Mik- β 2 tallentamisaika on Fermentation Research Institute, Agency of Industrial Science and
20 Technology, Japani. Mik- β 1:n ja Mik- β 2:n tallennusnumerot ovat vastaavasti 10453 ja 10454 (1988); ne on myös kuvattu japanilaisessa patenttihakemuksessa n:o 298742 (1988).

25 Muutama cDNA-kirjastojoukko valmistettiin tavanomaisilla menetelmillä käyttämällä YT-soluista saatua poly(A)⁺-RNA:a. cDNAkirjastot valmistettiin käyttämällä cDM8-vektoria julkaistujen menetelmien (21) mukaisesti, mutta käyttämällä jäljempänä esitetyn mukaisesti satunnaisprimeeriä (Amersham) tai oligo (dT)-primeeriä. Standardimenetelmällä valmistettiin 5,6x10⁶ itsenäistä pesäkettä
30 edustava plasmidi-DNA ja ensimmäiseen DNA- transfektioon käytettiin 1 mg DNA:a. Käytännössä DNA jaettiin 100 putkeen (jokainen putki sisälsi siten 10 μ g DNA:a) ja jokainen niistä transfektoitiin 3,5x10⁵ apinan cos-soluun kudostiljelymaljalla (60 mm polystyreenimalja, Corning). Transfektointi suoritettiin

käyttämällä DEAE-dekstraanistandardimenetelmiä. Sen jälkeen transfektoidut COS-solut käsiteltiin Mik- β 1- ja - β 2-vasta-aineiden seoksella (kummallekin vasta-aineelle 400-kertaisesti laimennetut askiitit) ja huuhdeltiin normaalilla tavalla. Huuhteluun käytetty malja oli FALCON 60 mm malja, joka oli päällystetty edellä kuvatulla tavalla anti-hiiri-ILgG:lla (viite 21). Tällä ensimmäisellä huuhtelukierroksella käytettiin 100 IgG-päällystettyä maljaa. Huuhtelun jälkeen valmistettiin normaalilla menetelmällä (viite 21) Hirt-uute ja talteenotetut plasmidit vietiin E.coliin viitteessä 21 kuvatulla menetelmällä. Tällä menetelmällä saatiin $3,7 \times 10^6$ pesäkettä. Nämä bakteeripesäkkeet fuusioitiin COS-solujen kanssa normaaleilla protoplastifuusiomenetelmillä (viite 21). Näissä fuusioko-
keissa käytettiin 26 Corning-maljaa, joista jokainen sisälsi 5×10^5 COS-solua. Fuusion jälkeen COS-solut huuhdeltiin edellä kuvatulla tavalla ja valmistettiin Hirt-uute. Hirt-uutteesta saatiin 32.000 bakteeripesäkettä. Fuusiointi ja huuhtelu toistettiin uudelleen, jolloin seuraavasta Hirt-uutteesta saatiin 32.000 bakteeripesäkettä. Sama menettely toistettiin vielä kerran, jolloin saatiin 28.000 bakteeripesäkettä (tällä välin tulisi kohdepesäkkeiden rikastua dramaattisesti). Samat menettelyt toistettiin vielä kerran ja saatiin 6.000 pesäkettä. Näistä pesäkkeistä valittiin mielivaltaisesti 30 pesäkettä ja analysoitiin cDNA-insertit. Näistä vain 7 pesäkettä sisälsi plasmideja, joista XhoI-restriktioentsyymillä
voitiin leikata cDNA-inserttejä. Vektoriperäiset XhoI-kohdat sijoitettiin cDNA:n kummallekin puolelle, ja kaikki muut plasmidit olivat menettäneet tällaiset katkaisukohdat DNA:n toisiintumisista johtuen; itse asiassa kaikkien niiden koko oli paljon pienempi kuin alkuperäisen vektorin. Niitä pidettiin siten epäspesifisinä tuotteina. Toisaalta kaikki nämä 7 pesäkettä olivat peräisin samasta mRNA:sta, mikä vahvistettiin tavanomaisen restriktioentsyymianalyysin avulla ja DNA-blot-analyysin avulla. Näistä yksi plasmidi, jolle annettiin nimeksi pIL-2R β 30, sisälsi pidemmän cDNA:n kuin muut 6 plasmidia, jotka vuorostaan osoittautuivat keskenään identtisiksi (nimeksi annettiin pIL-2R β 9).

Tässä menetelmässä eristimme sen vuoksi kaksi toisistaan riippumatonta cDNA-kloonia, pIL-2R β 9:n ja pIL-21 β 30:n; kumpikin ekspressiotuote reagoi spesifisesti vasta-aineiden kanssa. Nämä kaksi kloonia sisälsivät vastaavasti 1,3 kb ja 2,3 kb cDNA-insertit ja ne ristihybridisoituivat keskenään. Myöhempi

- cDNA-molekyylien sekvenssianalyysi osoitti, että ne edustavat samaa mRNA:a. Itse asiassa RNA-blotting-analyysi osoitti, että mRNA on kooltaan noin 4 kb (kts. jäljempänä). Myöhemmin seuloimme muita YT cDNA-kirjastoja käyttämällä koettimina kloonattuja cDNA-molekyylejä ja eristimme useita
- 5 riippumattomia cDNA-klooneja, jotka yhdessä kattavat koko IL-2R β -ketjun mRNA:n. Siten pIL-2R β 6 ja pIL-2R β 19 saatiin seulomalla cDNA-kirjastot koettimen pIL-2R β 9-cDNA-insertillä.

- Edellä mainitut plasmidit, jotka sisältävät ihmisen IL-2R β -sekvenssejä koodaavan cDNA:n, on tallennettu 2.3.1989 E.coli MC 1061/P3-kannassa Budapestin sopimuksen mukaisesti Fermentation Research Institute-kokoelmaan seuraavilla numeroilla:
- 10

	Plasmidi	Järjestysnumero
15	pIL-2R β 6	FERM BP-2312
	pIL-2R β 9	FERM BP-2313
	pIL-2R β 19	FERM BP-2314
	pIL-2R β 30	FERM BP-2315

- 20 Neljän kloonatun cDNA:n täydelliset nukleotidisekvenssit määritettiin (kuvio 1).

- Kuviossa 1 on esitetty ihmisen IL-2R β -ketjun cDNA:n rakenne. Kuvio 1a esittää kaaviollisesti kloonatuista cDNA-molekyyleistä johdettua mRNA:a. Alempana on annettu pisteviivoitettujen, vinoviivoitettujen, avoimien ja täytettyjen suora-
- 25 kulmioiden avulla vastaavasti mRNA:n signaalisekvenssi-, solunulkoinen-, transmembraani- ja sytoplasminen alue. Kuviossa 1b on esitetty ihmisen IL-2R β -ketjun cDNA:n nukleotidi- ja aminohapposekvenssit. Sekvenssi johdettiin seuraavana esitetystä edellä kuvattujen cDNA-kloonien täydellisestä DNA-sekvenssianalyysistä. Nukleotidit on numeroitu oikeaan marginaaliin ja aminohapot vasempaan marginaaliin. Kloonit pIL-2R β 19 ja pIL-2R β 6 sisälsivät kumpikin G-A-mutaation vastaavasti nukleotidiryhmissä 425 ja 1531. pIL-2R β 6 cDNA sai siten TAG-tripletin sytoplasmiseen alueeseen. Sen uskotaan olevan
- 30 käänteistranskriptiossa tapahtuneen virheen, koska kaikissa muissa klooneis-

sa, pIL-2R β 30:ssa, pIL-2R β 19:ssa ja pIL-2R β 16:ssa, on tässä asemassa TGG-tripletti. Ensimmäiset alleviivatut 26 aminohapporyhmää merkitsevät consensus-sekvenssin (22) ennustamaa signaalisekvenssiä. 25-transmembraani-aminohapporyhmää on merkitty paksulla alleviivauksella. Kysteiiniryh-
mät on neliöity. Potentiaaliset N-glykolysaatiokohdat on alleviivattu kahdesti.
Mahdolliset poly-adenylaatio-signaalit on esitetty avoimella suorakulmiolla.
Yhteenvetona voidaan sanoa, että RNA valmistettiin NK-maisesta ihmisen
lymfoidisolulinjasta YT ja cDNA-kirjastot valmistettiin käyttämällä CDM8-vektoria
julkaistujen menetelmien (21) mukaisesti paitsi, että käytettiin joko satun-
naisprimeerejä (Amersham) (pIL-2R β 6, 9 ja 30) tai oligo (dT) primeeriä (pIL-
2R β 19). cDNA-kirjastot seulottiin anti-IL-2R β -monoklonaalisten vasta-aineiden,
Mik- β 1:n ja Mik- β 2:n, cocktaililla edellä kuvatulla tavalla (21). Nukleotidisek-
venssit määritettiin dideoksiketjun päättämismenetelmän ja kemiallisen pilkko-
mismenetelmän yhdistelmällä.

Kuviossa 1 on esitetty, että cDNA sisältää suuren avoimen lukukehyksen, joka koodaa 551 aminohaposta koostuvaa proteiinia. Mitään merkittävää homologiaa muiden tunnettujen proteiinien kanssa ei löydetty Portein Sequence Database-tietokannasta (National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.) tai vielä uudempien julkaistujen sekvenssien kanssa. Vastoin kuin monet muut sytokiini-reseptorit, näyttää siltä, että IL-2R α - ja IL-2R β -ketjut eivät kuulu immunoglobuliinisuperperheeseen. Proteiinin johdetun rakenteen perusteella uskotaan 26 N-terminaalisen aminohapon esittävän signaalisekvenssiä. IL-2R β -ketjun valmis muoto muodostuu siten 525 aminohaposta lasketun molekyylipainon ollessa 58.358. Kuviossa 1 esitetyn mukaisesti reseptorimolekyyli muodostuu ekstrasellulaarisesta alueesta, jossa on 214 aminohappoa. Tämä alue sisältää 8 kysteiiniryhmää, joista 5 ryhmää on N-terminaalisessa puoliskossa, ja niiden välissä on melko säännöllisesti 9 - 12 aminohappoa. Kysteiiniryhmien välissä olevat disulfidididokset antavat todennäköisesti stabiilin konfiguraation ligandin sitoutumiselle. Itse asiassa kysteiiniryhmien runsaus näyttää olevan eräs monien reseptoreiden ligandeja sitovan alueen yleisimmistä piirteistä (23). Huomionarvoista voi olla, että aminohappojen (a.a.) ennustettu määrä IL-2R β -ketjun solun ulkoisella alueella (214

a.a.) on lähes verrattavissa IL-2R α -ketjun vastaavaan määrään (219 a.a.). Tällainen kokojen samankaltaisuus voi olla merkitsevää, kun otetaan huomioon heterodimeerisen reseptorikompleksin konformaatio, joka on täysin ainutkertainen tällä reseptorilla; sekä α - että β -ketjuilla on yksitellen vuorovaikutus saman IL-2-molekyylin selvästi erotettavien kohtien kanssa.

25 aminohapon hydrofobinen osa, joka ulottuu aminohaposta 215 aminohappoon 239, näyttää muodostavan reseptorin membraanivälialueen (kuviot 1 ja 2).

10

Kuviossa 2 on esitetty hydropatiakäyrä-analyysi johdetuista ihmisen IL-2R α - ja IL-2R β -ketjun prekursorien rakenteista. Analyysi suoritettiin Kyte'n ja Doolittle'n menetelmällä (38). SG ja TM esittävät vastaavasti signaalsekvenssiä ja transmembraanisekvenssiä.

15

13-ketjun sytoplasminen alue muodostuu 286 aminohaposta ja se on paljon suurempi kuin α -ketjun vastaava alue, joka on vain 13 aminohapon pituinen. β -ketjusta puuttuu tyrosiinikinaasin konsensussekvenssit (Gly-x-Gly-x-x-Gly) (25). Huomattakoon kuitenkin Ala-Pro-Glu (293-295)-tripletin mukanaolo; tämän on ilmoitettu olevan eräiden proteiinikinaasien katalyyttisen alueen konsensuskuvion (25). Toistaiseksi on testaamatta mahdollisuus, että β -ketjun sytoplasmisella alueella on proteiinikinaasi-aktiivisuus. Tämän alueen primääri-

20 rakenne paljasti vielä toisen mielenkiintoisen piirteen: melko voimakas taipumus tiettyjen tunnusomaisten aminohappojen läsnäololle. Tämä alue sisältää runsaasti proliini-(42/286)- ja seriini-(30/286)-ryhmiä. Mielenkiintoista kyllä-

25 kin "runsasproliininen" rakenne on osoitettu CD2:n T-solumembraanin antigeenin, joka liittyy T-solujen aktivoitumisreittiin, sytoplasmisessa alueessa (26). Runsasproliininen rakenne voi antaa tälle alueelle ei-pallomaisen rakenteen, joka voi olla tärkeä kytkettäessä reseptorimolekyyli muun signaali-

30 (-muuntajien) kanssa. Vallitsevat seriiniryhmät voivat olla pääkohde fosforylaatiolle, joka myös saattaa säätää reseptorin toimintaa (27). Sytoplasmisella alueella esiintyy lisäksi selvästi vinoumaa negatiivisesti varautuneiden aminohappojen suhteen. Itse asiassa tämä alue sisältää 40 tällaista aminohappoa

(so. glutamiini- ja asparagiinihapot), kun taas positiivisesti varautuneita ryhmiä (so. lyysiini ja arginiini) on vain 18 aminohappoa. Tällainen vinouma on erityisesti havaittavissa sytoplasmisen alueen keskiosassa (aminohapot 345-390). β -ketjun sytoplasmisen alue voi siten olla varsin hapan. Eräät, ja mahdollisesti kaikki, nämä ainutlaatuiset ominaisuudet yhdessä voivat olla syynä myötävirtaan tapahtuvan signaalitransduktion radan (ratojen) siirtymiseen edemmäksi. Reseptoriproteiini sisältää 5 potentiaalista N-kytkeytynyttä glykolysaatiokohtaa (kuvio 1B), joista 4 sijaitsee solunulkoisessa alueessa. Tällainen translaation jälkeinen modifikaatio voi olla syynä arvioidun valmiin (70-75kD) ja lasketun (58kD) proteiinimolekyylin molekyyllipainojen eroon. α - ja β -ketjujen hydropatiakäyrä-analyysi osoitti, että kummassakin ketjussa on aivan solumembraanin vieressä hydrofiilisiä alueita (kuvio 2). Näillä alueilla voi olla oma osuutensa kahden ketjun välisessä ei-kovalenttisessä molekyyllinsisäisessä liittymisessä.

15 Ihmisen IL-2R β -ketjun mRNA:n ekspressointi

IL-2R β mRNA:n ekspressoitumista tutkittiin käyttämällä koettimena pIL-2R β 30:sta saatua cDNA-inserttiä.

20 Kuvio 3a kuvaa ihmisen IL-2R β -ketjun mRNA:n ekspressointia erilaisissa solutyypeissä. Seuraavista solulähteistä preparoitiin poly(A)⁺RNA:a (2 μ g kaistaa kohti) ja niille suoritettiin RNA-blotting-analyysi käyttämällä koettimena XhoI:lla pilkottua ihmisen IL-2R β -ketjun cDNA-fragmenttia, joka oli saatu plasmidista pIL-2R β 30, noudattamalla standardimenetelmiä (14, 18, 27). Kaista 1, YT;

25 kaista 2, Hut102(HTLV-1:lla transformoitu ihmisen T-solulinja); kaista 3, MT-2(HTLV-1:lla transformoitu ihmisen T-solulinja), kaista 4, ARH-77 (multipelimyelooma-linja); kaista 5, SKW6.4 (EBV:lla transformoitu ihmisen B-lymfoblastoidilinja), kaista 6, U937 (histiosyyttinen leukemialinja); kaista 7, MT-1 (HTLV-1:lla transformoitu ihmisen T-solulinja), kaista 8, Jurkat (ihmisen T-leukemialinja); kaista 9, HeLa (ihmisen kohdunkaulasyöpäsolulinja).

30

Kuten kuviossa 3a on esitetty, RNA-blot-analyysi osoitti läsnäolevan 4kb mRNA:n, jonka ekspressoituminen on rajoittunut lymfoidisoluihin, joiden aikai-

semmin on identifioitu sisältävän IL-2R β -ketjun (so. YT, MT-2, Hut102, SKW6.4) (12, 16, 17). Toisaalta mRNA:n ekspressiota ei havaittu sellaisissa soluissa kuin Jurkat, MT-1, U937, ARH-77 ja HeLa. mRNA:n ekspressoitumistasot korreloivat oleellisesti IL-2R β -ketjun ekspressoitumistasojen kanssa.

5

Kuviossa 3b on esitetty IL-2R β - ja IL-2R α -mRNA-molekyylien ekspressoituminen ihmisen PBL:ssa. Jokainen kaista kuormitettiin kokonais-RNA:lla (15 μ g/kaista). Kaistat 1 ja 4 ovat stimuloimattomia ihmisen periferiaveren lymfosyyttejä (PBL); kaistat 2 ja 5 ovat PBL-soluja, jotka on stimuloitu 5 μ g/ml fytoemaglutiinilla (PHA) 24 tunnin ajan; kaistat 3 ja 4 ovat PBL-soluja, jotka on stimuloitu 72 tuntia 5 μ g/ml PHA:lla. RNA-blotattu suodatin hybridisoitiin IL-2R β -koettimen kanssa (kaistat 1-3) IL-2R β -koettimen dehybridisoinnin jälkeen sama suodatin hybridisoitiin IL-2R α -koettimen kanssa (pSVIL2R-3:sta saatu XbaI-BclI-fragmentti (14) (kaistat 4-6)).

15

Mielenkiintoista oli, että IL-2R β -mRNA voitiin detektoida stimuloimattomissa PBL-soluissa ja että sen ekspressoitumistasot kasvoivat väliaikaisesti vain 2,5-kertaisiksi mitogeenilla stimuloinnin jälkeen. Aikaisemmin virtaussytometri-analyysistä saatujen tulosten perusteella (19) on todennäköistä, että mRNA:n indusointikuviot ovat erilaisia erilaisten lymfosyyttipopulaatioiden kesken. Tämä ekspressoitumiskuvio on täysin erilainen kuin IL-2R α -ketjulla, jonka ekspressio ehdottomasti edellyttää solujen mytogeenistä stimulointia (kuvio 3b), mikä viittaa siihen, että näiden kahden geenin välillä on erilaiset geenin ekspressoitumismekanismit.

25

PBL:sta ja eri solulinjoista, mukaanlukien HTLV-1:lla transformoiduista ihmisen T-solulinjoista, saadun genomi-DNA:n southern blot-analyysi osoittaa, että geeni on mukana yhtenä ainoana kopiona ja että se ei ole uudelleenjärjestäytynyt näihin soluihin.

30

cDNA:n koodaaman IL-2R β -ketjun IL-2:n sitomisominaisuudet

Seuraavaksi suoritimme joukon cDNA:n ekspressoititutkimuksia, joiden tarkoituksena oli tutkia, sitoutuuko cDNA-tuote IL-2:aan ja onko sillä todella ne IL-2R β -ketjun ominaisuudet, jotka on aikaisemmissa tutkimuksissa osoitettu ja/tai ehdotettu. Rakennettiin kaksi cDNA:n ekspressoitiplasmidia, joissa koko koodaavan alueen ylittävää cDNA:n ekspressoitumista ohjattiin joko hiiren *lck*-geenin (29) promootorilla (pLCKR β) tai malonileukemiaviruksella LTR (30) (pMLVR β).

10

Ekspressoitivекторit rakennettiin seuraavilla menetelmillä. pIL-2R β 30 pilkottiin HindIII:lla (katkaisukohta sijaitsee CDM8:n polylinkkerialueiden sisällä) ja molempien päiden täyttämisen jälkeen liitettiin ja ligatoitiin uudelleen BamHI-linkkeri. Saatu plasmidi pilkottiin tämän jälkeen BamHI:lla ja 1,8kb DNA-fragmentti, joka sisältää β -ketjua koodaavan koko sekvenssin, vietiin pLCKR β :n rakentamiseksi BamHI:lla pilkottuun p1013-vektoriin, joka sisältää hiiren *lck*-promootorin. BamHI:lla pilkottu cDNA-fragmentti vietiin pMLVR β :n rakentamiseksi myös retrovirus-vektoriin pZipSV(X) (30). pSVIL2R-3:sta (14) saatiin ihmisen IL-2R α :n ekspressoitivекtori pSVIL2Rneo korvaamalla Eco-gyptgeeni neo-resistenttiysgeenillä.

20

Plasmidi pLCKR β vietiin hiiren T-lymfooma EL-4 ja ihmisen T-soluleukemia Jurkat-linjoihin, joilta kummaltakin tiedetään puuttuvan ihmisen IL-2:a sitovat pintamolekyylit.

25

Ekspressoitiplasmidien transfektointi Jurkat- ja EL-4-soluihin electroporation-menetelmällä jo kuvatulla tavalla (39). Transfektoidut solut valittiin RPMI1640-alustassa, joka sisälsi 10 % vasikansikiöseerumia (FCS) ja G418:a (1 mg/ml EL-4:lla ja 1,5 mg/ml Jurkat-soluilla). Sellaisten solujen saamista varten, jotka ekspressoivat samanaikaisesti ihmisen IL-2R α - ja IL-2R β -ketjujen cDNA:t, Jurkat-solusta johdettu, pSVIL2Rneo:lla transfektoitu klooni J α -5 ko-transfektoidtiin pLCKR β :lla ja plasmidilla, joka sisälsi hygromysiini-resistenttiysgeenin pHgy. Transfektoidut solut valittiin 200 μ g/ml hygromysiinillä. pMLVR β :n

30

transfektointi 2 soluun suoritettiin kalsiumfosfaatti-menetelmällä jo kuvatulla tavalla (14) ja solut valittiin 700 µg/ml G418:lla. Virtaussytometristä analyysiä varten 5×10^5 solua käsiteltiin vasta-aineella (askiittien 1:500 laimennus) 4°C:ssa 30 minuutin ajan. Solut värjättiin pesun jälkeen fluoreseiinin kanssa

5 konjugoidulla vuohen anti-hiiri-IgG:lla.

Värjätyt solut analysoitiin FACS440-virtaussytometrillä (Beckton Dickinson).

125 I-IL-2:n sitoutumismääritys ja Scatchard'in käyrä-analyysi suoritettiin jo kuvatulla tavalla (12).

10

Kuvio 4a havainnollistaa ihmisen IL-2R α - ja/tai IL-2R β -ketjun cDNA-molekyylien ekspressoitumista käyttämällä apuna ihmisen IL-2R α - ja/tai IL-2R β -cDNA-transfektanttien solupintojen värjäytymistä. Emusolut ja eri transfektanttisolut värjättiin erikseen joko monoklonaalisella anti-ihmis-IL-2R α -vasta-aineella

15 anti-Tac (-----) tai monoklonaalisella anti-ihmis-IL-2R β -vasta-aineella Mik- β 1 (——).

Pisteviiva (.....) on solujen, jotka on värjätty pelkästään fluoreseiinin kanssa konjugoidulla vuohen anti-hiiri-IgG:lla, fluoresenssiprofiili. Käytetyt

solut olivat (1) EL β -13 (ja EL-4:sta johdettu, pLCKR β :lla transfektoitu kloon),

(2) J β -8 (Jurkat-soluista saatu, PLCKR β :lla transfektoitu kloon), (3) J α -5

20 (Jurkat-soluista saatu, pSVIL2Rneo:lla transfektoitu kloon), (4) J α -2 (J α -5:sta saatu, pLCKR β :lla transfektoitu kloon), (5) J α β -10 (J α -5:sta saatu, pLCKR β :lla transfektoitu kloon) ja (6) F β -3 (NIH3T3:sta saatu, pMLVR β :lla transfektoitu linja).

25 FACS-analyysin perusteella (kuvio 4a) saatiin sekä EL-4:lla (EL β -13) että Jurkat:lla (J β -8) stabiileja transformanttiklooneja, jotka ekspressoivat cDNA-tuotteen. Lisäksi veimme saman geenin Jurkat-transformanttikloonin J α -5, joka ekspressoi transfektoidun, ihmisen IL-2R α -ketjun cDNA:n. Kahden saadun transformantin, J α β -2:n ja J α β -10:n, havaittiin ilmentävän sekä α - että β -ketjun

30 (kuvio 4a-(4), (5)). Kuten oli odotettuakin, näissä transformanteissa ekspressoitun RNA:n RNA-blotting-analyysit osoittivat, että α - ja β -ketjulle spesifiset mRNA:t ovat peräisin transfektoiduista cDNA-molekyyleistä, mutta ei endogeenisistä geeneistä (26). cDNA-tuotteen ominaisuuksien tutkimiseksi ei-lymfoidi-

soluissa vietiin plasmidi pMLVR β myös NIH3T3-solusta saatuun solulinjaan 2 (30), jolloin saatiin cDNA:n ekspressoiva transformantti F β .3 (kuvio 4a-5)).

5 IL-2:n sitoutumistutkimukset suoritettiin 125 I:lla leimatulla, ihmisen rekombinantti-IL-2:lla.

Kuvio 4b havainnollistaa α - ja β -ketjujen ekspressoitumista suorittamalla Scatchard'in käyrä-analyysi 125 I-IL-2:n sitoutumiselle kloonattuja cDNA-molekyylejä ekspressoiviin transfektantteihin. IL-2:n sitoutumisarvojen Scatchard'in
10 käyrä, kun mukana ei ole (-o-o-) tai kun mukana on (-•-•-) Mik- β 1:n 1:100-laimennettuja askiitteja. Mik- β 1 esti täydellisesti 125 I-IL-2:n sitoutumisen EL β -13 tai J β -8-klooneihin. Mitään spesifistä IL-2:n sitoutumista ei havaittu, kun tutkittiin Jurkat- tai EL-4-emosolut. IL-2:n sitoutumiskohtien lukumäärä solua kohti ja reseptorin affiniteetti määritettiin analysoimalla tietokoneen avulla IL-2:n sitou-
15 tumisarvot. (1) EL β -13, (2) J β -8, (3) J α -5, (4) J $\alpha\beta$ -2, (5) J $\alpha\beta$ -10.

Kuten voidaan havaita, EL-4:sta saadulla kloonilla (EL β -13) ja Jurkat:sta saadulla kloonilla (J β -8), jotka molemmat ekspressoivat β -ketjun cDNA:n, oli keski-suuri affiniteetti IL-2:aan, arvioitujen K_d-arvojen ollessa vastaavasti 4,0 nM ja
20 2,7 nM. Mik- β 1-vasta-aine esti täydellisesti IL-2:n sitoutumisen näihin soluihin (kuvio 4b-(1), (2)). Jurkat:sta saaduilla J $\alpha\beta$ -2- ja J $\alpha\beta$ -10-klooneilla, jotka ekspressoivat sekä ihmisen IL-2R α :n että IL-2R β :n cDNA:t, oli sekä suuri- että
25 pieniaffiniteettisia reseptoreita arvioitujen K_p-arvojen ollessa vastaavasti 22 pM ja 15 nM J $\alpha\beta$ -2:lla ja 19 pM ja 33 nM J $\alpha\beta$ -10:lla. Sitä vastoin vain α -ketjun cDNA:n ekspressoivilla Jurkat:sta saaduilla J α -5-emosoluilla oli yksinomaan alhainen affiniteetti (K_d: 19,5 nM) IL-2:n suhteen (kuvio 3b-(3)). Suuriaffiniteettisten IL-2R:n ekspressoivien J $\alpha\beta$ -2-solujen ja J $\alpha\beta$ -10:n lukumäärä oli verrattavissa ekspressoitujen IL-2R β -molekyylien määrään. Näiden solujen
30 käsittely Mik- β 1-vasta-aineella tuhosi lisäksi täysin suuriaffiniteettiset IL-2:n sitomiskohdat solupinnalta samalla, kun matala-affiniteettisen IL-2R:n ekspresio säilyi (kuvio 4b-(4), (5)). Nämä havainnot osoittavat yksiselitteisesti, että CDNA:n koodaama IL-2R β -molekyyli ottaa suoraan osaa suuriaffiniteettisen reseptorikompleksin muodostumiseen yhdessä IL-2R α -ketjun kanssa. Päinvas-

toin kuin edellä mainituilla T-solutransformanteilla ei F β -3-soluilla ollut mitään IL-2:n sitoutumista solun pintaan samoissa sitoutumisolosuhteissa. Mielenkiintoista kyllä sama havainto tehtiin apinan COS-soluilla, jotka ekspressoivat β -ketjun mutta eivät sitoneet IL-2:a (28). Tulokset viittaavat siten siihen, että

5 funktionaalisen IL-2R β -ketjun ekspressointiin ottaa osaa joko solutyypille spesifinen prosessointimekanismi (-mekanismit) tai jokin muu solukomponentti (-komponentit) tai molemmat.

Rekonstituoidun IL-2R:n molekyyliarakenteen jatkokarakterisointia varten suoritimme kemiallisia ristisidostuskokeita 125 I-IL-2:n ja pilkkoutumattoman kemiallisen silloittajan, disukkinimidyylisberaatin (DSS) kanssa.

10

Kuvio 5 havainnollistaa IL-2R-positiivisten transformanttien affiniteetti-ristisidostustutkimusten tuloksia. Soluja-inkuboitiin 5 nM (kaistat 1-13) tai 100 pM

15 (kaistat 14-16) 125 I-IL-2:n kanssa, kun mukana ei ollut (kaistat 1-4, 14-16) tai kun mukana oli 250-kertainen mooliylimäärä leimaamatonta IL-2:a (kaistat 5-7), 500-kertainen mooliylimäärä affiniteettipylväässä puhdistettua Mik- β 1:a (kaistat 8-10) tai 500-kertainen mooliylimäärä affiniteettipylväässä puhdistettua anti-Tac:ia (kaistat 11-13). Sen jälkeen solut ristisidostettiin kemiallisesti

20 disukkinimidyylisuberaatin (DSS) kanssa jo kuvatulla tavalla (16). Tämän jälkeen solut liuennettiin ja supernatantit ajettiin 7,5 % SDS-PAGE:lla. Käytetyt solut olivat: Jurkat (kaista 1); J α -5 (kaistat 2, 5, 8, 11, 14); J β -8 (kaistat 3, 6, 9, 12, 15); J $\alpha\beta$ -10 (kaistat 4, 7, 10, 13, 16). Markkerina (M) käytettiin 125 I-IL-2:n kanssa ristisidostettuja YT-soluja.

25

Kuviosta voidaan nähdä, että vain IL-2R β -ketjun ekspressoivat solut ristisidostettiin 125 I-leimatun IL-2:n kanssa ja analysoitiin SDS-PAGE:lla, jolloin detektointiin kaksoisvyöhyke, joka muodostui 90 kD päävyöhykkeestä ja 85 kD pienemmästä vyöhykkeestä ja jonka kulkeutumisprofiili ei ollut erotettavissa YT-solujen profiilista (kts. nuolet kuviossa 5 ja viitteet 16, 17). Leimaamattoman IL-2:n ylimäärä tai Mik- β 1 esti kaksoisvyöhykkeen muodostumisen. Kaksoisvyöhykkeen muodostuminen voi johtua reseptori-IL-2-kompleksin hajoamisesta. Mahdollista on myös se, että kummatkin proteiinituotteet ovat peräisin jälkitransla-

30

tionaalisesta erottavasta modifikaatiosta (-oista). Toinen kaksoisvyöhyke voi vaihtoehtoisesti olla reseptorikompleksin kolmas komponentti. Transfektantis-
sa ($J\alpha\beta$ -10) sekä YT-soluissa havaittiin myös leveä vyöhyke, joka kulkeutuu
noin 150 kD kohdalla. Myös tämän vyöhykkeen muodostuminen estyi joko
5 leimaamattoman IL-2:n tai Mik- β 1:n vaikutuksesta. Se voi olla IL-2-, IL-2R α -
ja IL-2R β -molekyylien ternäärinen kompleksi. Kuviossa 4 esitetystä, kemialli-
sessa ristisidostuskoesarjassa osoitettiin, että $J\alpha\beta$ -2:n pinnalla ekspressoidun
reseptorikompleksin fysikokemialliset ominaisuudet eivät ole erotettavissa
viljellyillä T-soluilla tai PBL:lla ekspressoidun suuriaffiniteettisen reseptorin
10 ominaisuuksista (12, 16, 17).

Alustavat tulokset kokeista, joissa määritettiin, johtaako α - ja β -ketjujen eks-
pressio ei-lymfoidisoluihin suuriaffiniteettisen reseptorin muodostumiseen,
osoittavat, että kun α - ja β -ketjun cDNA:t koekspressoituvat väliaikaisesti COS-
15 soluissa, molemmat ketjut voivat ristisitoutua ^{125}I -IL-2:n kanssa sellaisessa
konsentraatiossa (400 pM), jossa samalla tavalla ekspressoitu α -ketju ei yksi-
nään voi (28). Tulokset voivat viitata $\alpha\beta$ -heterodimeerisen reseptorin, muodos-
tumiseen tässä ei-lymfoidisolulinjassa.

20 IL-2:n internalisointi rekonstituoitujen reseptoreiden toimesta

Keksiiaffiniteettisten ja suuriaffiniteettisten IL-2-reseptoreiden on raportoitu
kummankin kykenevän internalisoimaan IL-2:n (33-35). Ligandin internalisoin-
tiin liittyy tavallisesti IL-2:n signaalin transduktio, mikä viittaa siihen, että tämä
25 prosessi on välttämätön.

Kuvio 6 havainnollistaa IL-2:n internalisoitumista rekonstituoitujen reseptorei-
den kautta. IL-2:n internalisoitumista tutkittiin aikaisemmin kuvatulla menetel-
mällä (33). Lyhyesti sanottuna solut (5×10^7) käsiteltiin ^{125}I -IL-2:lla 200 pM
30 ($J\alpha\beta$ -10) tai 5 nM ($J\alpha$ -5, $J\beta$ -8 ja EL β -13) loppukonsentraatiossa 30 minuutin
ajan 0°C:ssa. Pesun jälkeen solut suspendoitiin esilämmitettyyn viljelyalustaan
(37°C) ja IL-2:n internalisoitumisen kinetiikkaa tutkittiin aikaisemmin kuvatulla

tavalla (33). (a) EL β -13, (b) J β -8, (c) J $\alpha\beta$ -10, (d) J α -5. (---●---), internalisoitu IL-2; (...o...o...), solupintaan sitoutunut IL-2; (-■-■-■-■-), vapaa IL-2.

- Kuten kuviossa 6 on esitetty, tutkimme, kykenevätkö rekonstituoidut reseptorit internalisoimaan IL-2:n. Itse asiassa solut, jotka ekspressoivat vain IL-2R β -ketjun tai sekä α - että β -ketjut, kykenevät internalisoimaan IL-2:n noudattamalla kinetiikkaa, joka on samanlainen kuin mitä on raportoitu natiiville reseptorille. Sitä vastoin Jurkat-solut, jotka ekspressoivat vain IL-2R α :n, eivät kyenneet internalisoimaan IL-2:a vastaten aikaisemmin raportoituja havaintoja (33, 34).
- Alustavat tulokset osoittavat, että IL-2 inhiboi selektiivisesti solujen, jotka ekspressoivat keskiaffiniteettisia tai suuriaffiniteettisiä reseptoreita, kasvua (14, 36). Meillä on myös alustavia tuloksia siitä, että toisessa isäntäsolulinjassa ekspressoitu β -ketju stimuloi IL-2:n reaktiona tapahtuvaa solukasvua (28).

15 Hiiren IL-2R-reseptorin β -ketjun kloonauk

Hiiren IL-2-reseptorin β -ketjulle ei tiedetä olevan olemassa mitään spesifisiä vasta-aineita ja siten ei käytetty seulontamenetelmää, jota käytettiin cDNA:n eristämiseen Hu IL-2R β -ketjua varten.

20

cDNA-kirjasto valmistettiin käyttämällä konkanavaliini A:lla stimuloituista hiiren pernasoluista saatua poly (A)⁺-RNA:a; cDNA kloonattiin λ gt 10:ssa, joka monistettiin E.coli:ssa.

- 25 Sen jälkeen tämä kirjasto seulottiin käyttämällä koettimena edellä kuvattua ihmisen IL-2R β -ketjun cDNA:a ei-stringenteissä olosuhteissa. Positiivisista klooneista valittiin yksi kloon, jolle annettiin nimeksi λ MIL 2R β -26. Tämän kloonin cDNA-insertti sisälsi vain 540 bp sekvenssin hiiren IL-2R β -ketjun koko sekvenssistä. Sen vuoksi tämä sekvenssi eristettiin pilkkomalla λ MIL-2R β -26
- 30 Pvu 2:lla ja käytettiin toisen cDNA-kirjaston seulomiseen, joka oli valmistettu standardimenetelmillä hiiren kateenkorvakasvainsolulinjasta EL-4 saatua poly(A)⁺:a, ja kloonattu CDM8-vektorin BstXI-kohtaan E. coli'n transfektioinnin jälkeen.

cDNA-kirjasto seulottiin erittäin stringenteissä olosuhteissa seuraavissa julkaisuissa kuvatuilla menetelmillä: eurooppalainen patenttihakemus n:o 88 119 602.9 ja Kashima et al. (Nature Vol. 313 ss. 402-404, 1985).

- 5 Positiivisista klooneista valittiin hiiren IL-2R β :n rakennegeenin (kts. kuvio 8) sisältävä kloonin pMIL-2R β -36. cDNA-kloonin restriktiokartta on esitetty kuviossa 7.

Plasmidi pMIL-2R β -36 on tallennettu E. coli MC 1061/P3-kannassa 23.5.1989

- 10 Fermentation Research Institute-kokoelmaan Budapestin sopimuksen mukaisesti numerolla FERM BP-2435.

Liukoisen ihmisen interleukiini 2:n reseptorin β -ketjun valmistaminen

- 15 hIL2-R β -ketjun erittynyt muoto (jäljempänä käytetään nimitystä liukoinen 13) valmistettiin transfektoimalla NIH 3T3-fibroblastit modifioidulla β -ketjun cDNA:lla ("ankkuri-minus" cDNA), jolta puuttuu koko DNA-sekvenssi, joka koodaa natiivin β -ketjun sekä intrasytoplasmista että transmembraanialuetta.

- 20 Ankkuri-minus cDNA:n sisältävän ekspressoinevektorin, joka koodaa liukoista β , rakentaminen (BCMGNeo-sol. β)

- β -ketjun cDNA (kuvio 1b) modifioitiin ankkuri-minus-muotoon liukoisen β :n tuottamista varten. Kuviossa 9 on havainnollistettu strategia, jota käytettiin muodostamaan ankkuri-minus-cDNA:n sisältävä ekspressoinevektori. Plasmidi pIL-2R β 30, joka sisältää 2,3 kb β -ketjun cDNA:n CDM8-vektorissa, pilkottiin ensin BssH II:lla ja Sma I:lla (kaikkien restriktioentsyymien nostopaikka oli New England BioLabs, Beverly, MA, USA), jolloin saatiin 1,9 kb cDNA-fragmentti (emäket 58-1967), joka sisälsi β -ketjun koko koodaavan sekvenssin (emäket 121-1773). BssH II-pään täyttämisen jälkeen insertoitiin 1,9 kb cDNA pBluescript SK-vektorin (Stratagene, San Diego, CA, USA) Sma I-restriktiokohtaan. Tämä pBluescript SK- β 1.9-plasmidi pilkottiin sen jälkeen Sty I:lla (restriktiokohdat; emäket 825, 934 ja 1235) ja Sma I:lla, jolloin kaikki

intrasytoplasmiset ja transmembraanialueet deletoituiivat niin, että jäljelle jäivät emäkset 121-840, jotka edustavat suurinta osaa solunulkoisesta alueesta ehjänä. Seuraavaksi fosforyloitiin 12-emäksinen synteettinen linkkeri (New England BioLabs, n:o 1060), joka sisälsi multippelit terminaatiokodonit (TAG) sekä

5 Nhe I:n tunnistamissekvenssin, ja liitettiin T4 DNA-ligaasilla Sty I/Sma I-pilkottiin plasmidi-DNA:an. Ylimääräinen linkkeri poistettiin pilkkomalla Nhe I:lla, minkä jälkeen pBluescript SK-sol.β rakennettiin liittämällä DNA Sk-vektoriin.

Tämä pBluescript SK-sol.β pilkottiin Sal I:lla ja Not I:lla (restriktiokohdat sijoitettiin pBluescript SK-vektorin polylinkkerialueelle) ja ristettiin saatu liukoista β koodaava 0,8 kb cDNA-fragmentti. Tämä cDNA-fragmentti vietiin lopullisen ekspressioplasmidin BCMGN-sol.β muodostamiseksi Xho I/Not I-pilkottuun BCMGNeo-vektoriin (kts. Karasuyama et al., J. Exp. Med. 169: 13-25, 1989), joka sisälsi sytomegalovirus (CMV)-promoottorin ja neomysiinin resistenttiys-

15 geenin. BCMGNeo on sukkulavektori, joka sisältää 69 % BPV (bovine papilloma virus)-sekvenssejä, jotka varmistavat ekstrakromosomaalisen replikoitumisen nisäkässoluissa. Kuten on esitetty kuviossa 10, joka havainnollistaa natiivin ja liukoisen β:n nukleotidisekvenssiä ja vastaavaa aminohapposekvenssiä, liukoisen β:n cDNA koodaa 212 aminohaposta (aa) muodostuvaa proteiinia,

20 johon liittyy 26 aminohapon signaaliptidi, kun taas natiivin β-ketjun cDNA koodaa membraaniproteiinia, joka muodostuu signaaliptidistä (26 aa), ekstrasellulaarisesta (214 aa), transmembraanista (25 aa) ja intrasytoplasmisesta (286 aa) alueesta. Kuviossa 10 on myös havainnollistettu natiivin ja liukoisen β:n nukleotidisekvenssejä ja vastaavia aminohapposekvenssejä.

25

NIH 3T3-fibroblastin transfektointi BCMGNeo-sol.β:lla ja liukoista β erittävien stabiilien transformanttien kehittäminen

cDNA-transfektointi suoritettiin Karasuyama'n et al. (supra.) kuvaamalla protoplastifuusio-tekniikalla. Lyhyesti sanoen BCMGNeo-sol.β:n sisältämät bakteerit muunnettiin protoplasteiksi ja fuusioitiin hiiren fibroplastisolulinjan NIH 3T3:n kanssa käyttämällä polyetyleeniglykolia 2.000 (Wako Chemical Industries, Osaka, Japani). Kymmenen miljoonaa protoplastifuusioitua NIH 3T3-solua

30

siirrostettiin tämän jälkeen neljään 24-kaivoiseen levyyn. 25 päivän kuluttua siitä, kun oli viljelty RPMI 1640-alustassa, joka sisälsi 10 % vasikansikiöserumia (FCS) ja 750 µg/ml G418:a (genetisiini; Sigma, St. Louis, MO, USA), havaittiin transformanttisolujen kasvua 60 kaivossa 104 kaivosta. Kahdeksastoista kaivosta 60:stä saatujen viljelysupernatanttien havaittiin olevan positiivisia liukoisen β suhteen, kun määrittäminen suoritettiin jäljempänä kuvatulla ELISA-menetelmällä (sandwich enzyme-linked immunosorbent assay). Kaivoja rajalaimentamalla määritettiin viisi kloonia, joista saatiin korkein absorbanssi ELISA:ssa. Kaikkien näiden havaittiin erittävän suuria määriä liukoista β (taulukko I). NIH 3T3-solut, joka oli transfektoitu täyspitkällä β -ketjun cDNA:lla (nimeksi annettiin 3T3- β 11), eivät sitä vastoin erittäneet lainkaan β -ketjun molekyyliä. Myöhemmissä tutkimuksissa käytimme kloonia 3T3- β 4-14, joka eritti suurimman määrän liukoista β .

15 Taulukko 1

Liukoisen β :n määrät BCMGNeo-sol. β :lla transfektoitujen NIH 3T3-fibroblastien viljelysupernatantissa.

20	Viljelty supernatantti	Absorbanssi 405 nm:ssa ELISA:ssa
	3T3-B4-1	1,492
	3T3-B4-4	1,301
	3T3-B4-7	1,259
	3T3-B4-14	1,579
25	3T3-B4-19	1,533
	3T3-1311	0,052
	vain alusta	0,072

Liukoisen β :n detektointi ELISA:lla

30

Transfektoitujen solujen viljelysupernatanteissa seulottiin liukoisen β :n mukanaolo ELISA-menetelmällä (sandwich enzyme linked immunosorbent assay).

Tässä määrittäksessä käytettiin kahta monoklonaalista vasta-ainetta Mik- β 1 ja

- β 3, supra. ja Tsudo et al., Proc. natl. Acad. Sci. USA, 86: 1982-1986, 1989. Nämä vasta-aineet tunnistavat β -ketjun eri epitoopit; so. Mik- β 1 tunnistaa IL-2:n sitomiskohdan, kun taas Mik- β 3 tunnistaa epitoopin, joka ei osallistu IL-2:n sitomiseen. Kuten kuviossa 11, joka esittää kaaviollisesti Sandwich ELISA:n, on kuvattu, päällystettiin Immulon-I-mikrotiitterilevyt (Dynatec, Chantilly, VA, USA) yön yli 50 μ l Mik- β 3:lla 10 μ g/ml konsentraatiossa Tris-puskuroidussa kyllästetyssä suolaliuoksessa (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl). Ylimääräisen vasta-aineen poistamisen jälkeen sitoutumattomat kohdat blokattiin inkuboimalla 1 tunti TBS:n kanssa, joka sisälsi 1 % naudanseerumi-

5 ELISA:n, on kuvattu, päällystettiin Immulon-I-mikrotiitterilevyt (Dynatec, Chantilly, VA, USA) yön yli 50 μ l Mik- β 3:lla 10 μ g/ml konsentraatiossa Tris-puskuroidussa kyllästetyssä suolaliuoksessa (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,15 M NaCl). Ylimääräisen vasta-aineen poistamisen jälkeen sitoutumattomat kohdat blokattiin inkuboimalla 1 tunti TBS:n kanssa, joka sisälsi 1 % naudanseerumi-

10 albumiinia. Pestiin TBS:lla, joka sisälsi 0,05 % Tween 20:a (T-TBS), minkä jälkeen kaivoihin lisättiin 50 μ l transformanttien viljelysupernatantteja ja inkuboitui 1 tunti. Pesun jälkeen lisättiin 50 μ l biotinyloitua Mik- β 1:a 1 μ g/ml konsentraatiossa sekundäärisenä vasta-aineena, jotta voitaisiin detektoida levyn primääriseen vasta-aineeseen, Mik- β 3:een sitoutunut liukoinen β . 45 minuutin

15 inkuboinnin ja sitä seuraavan pesun jälkeen lisättiin 50 μ l alkalisen fosfataasin kanssa konjugoitua avidiinia (Tago, Burlingame, CA, USA). 45 minuutin inkuboinnin jälkeen levyt pestiin, lisättiin 100 μ l p-nitrofenyylifosfaattia ja kaivojen absorbanssi mitattiin aallonpituudella 405 nm 45 minuutin kuluttua.

20 Erittyneen liukoisen β :n näennäinen molekyylipaino

Liukoisen β :n molekyylikoon määrittämistä varten leimattiin 3T3-B4-14-solut biosynteettisesti 35 S-metioniinilla ja liukoinen β immunosaostettiin viljelysupernatantissa Mi- β 1 mAb:lla. 8-prosenttinen SDS-polyakryyliamidigeeli panostettiin eri määrillä immunosaosteita käyttämällä saostamiseen Mik- β 1- ja kontrol-

25 tiin eri määrillä immunosaosteita käyttämällä saostamiseen Mik- β 1- ja kontrol-

lina UPC 10 mAb:a ja elektroforesoitiin. Kun geeli tutkittiin SDS-polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (PAGE), Mik- β 1, mutta ei UPC 10 mAb-kontrolli, tunnisti 3T3-B4-14-solujen viljelysupernatantissa yhden ainoan proteiinilajin, jonka näennäinen Mr oli 37.000, kuten on esitetty kuviossa 12. Tämä molekyylipaino vastaa hyvin typistettyä β -ketjua, jolta puuttuvat kaikki transmembraani-

30 lipaino vastaa hyvin typistettyä β -ketjua, jolta puuttuvat kaikki transmembraani-

(25 aa)- ja sytoplasmansisäiset (286 aa)-alueet.

Liukoisen β :n IL-2:n sitomiskyky

Tämän jälkeen tutkittiin, kykeneekö 3-ketjun erittynyt muoto sitomaan IL-2:n.

Tähän tarkoitukseen käytettiin "kilpailevaa" sandwich ELISA-menetelmää.

- 5 Tässä määrittämisessä kiinnitettiin viljelysupernatantin liukoinen β kiinteään faasiin Mik- β 3 mAb:lla, joka mAb ei estä IL-2:n sitoutumista, jolloin oletettu IL-2:n sitomiskohta β -ketjulla jäisi vapaaksi. Sen jälkeen lisättiin biotinyloidun Mik- β 1:n kilpailijoiksi IL-2:n tai leimaamattoman Mik- β 1:n sarjalaimennuksia. Kuviossa 13 on esitetty kilpailevan sandwich-ELISA:n tulokset. Käyrä -o-o-
- 10 esittää leimaamattoman Mik- β 1:n sarjalaimennuksia ja -o-o- IL-2:n sarjalaimennuksia. Kuten kuviossa 13 on esitetty, leimaamaton Mik- β 1 alensi absorbanssia annoksesta riippuvalla tavalla, mikä on osoitus tämän systeemin spesifisyydestä. Myös IL-2 kilpaili tehokkaasti ja annoksesta riippuvalla tavalla biotinyloidun Mik- β 1:n kanssa liukoiseen β :n sitoutumisesta, mikä osoittaa, että
- 15 liukoinen β todella kykenee sitomaan IL-2:n.

- Tämä kilpailukäyrä on varsin samanlainen kuin mitä saadaan detergentillä liuennetulle natiiville β -ketjulle YTS-soluista, jotka ekspressoivat pelkästään β -ketjun, mikä osoittaa, että liukoisen β :n affiniteetti IL-2:een on verrattavissa
- 20 liukoisen natiivin β -ketjun vastaavaan affiniteettiin.

- IL-2R β -ketjuja koodaavien geenien saatavilla olo tekee mahdollisesti etsiä uusia tapoja, joilla IL-2-systeemin toimintaa voidaan tutkia. IL-2-systeemissä toimiva reseptorirakenne on ainutlaatuinen siinä suhteessa, että kaksi raken-
- 25 teellisesti eri membraanimolekyyliä, IL-2R α - ja IL-2R β -ketjut, sitovat toisistaan riippumatta molemmat IL-2:t. Tässä yhteydessä kuvattu esimerkkisarja cDNA:n ekspressiosta tukee edelleen aikaisempaa käsitystä, että α - ja β -ketjut muodostavat suuriaffiniteettisen IL-2R-kompleksin liittymällä ei-kovalenttisesti molekyylien kanssa (18, 37). Tämän systeemin omituisuus on siten se, että
- 30 kyseessä on kolmen molekyylin vuorovaikutus yhden ligandin ja kahden eri reseptorin välillä. Esillä olevan keksinnön ansiosta on nyt mahdollista selvittää tämän ainutkertaisen sytokiiniin reseptorisysteemin funktionaaliset alueet.
- Kloonatun β -ketjun cDNA:n mutaatioanalyysi voi antaa viitteitä niiden vastaavi-

en alueiden identifioimiseen, jotka ottavat osaa ligandin sitomiseen ja α -ketjuun liittymiseen. Tähän päivään mennessä tiedetään vain vähän siitä bioke-
miallisten tapahtumien sarjasta, jonka homologisten reseptoreidensa kanssa
toimivat sitokiinit laukaisevat. Tämän keksinnön avulla olemme osoittaneet

- 5 IL-2R β -ketjussa suuren sytoplasmisen alueen, joka mitä todennäköisimmin
ottaa osaa IL-2:n signaalin reitin (reittien) käyttöön. Sytoplasmisella alueella
havaittu erityisen hapan kohta voi viitata kytkeytymiseen muihin sytoplasmisiin
signaalimuuntajiin. Aikaisemman raportin (33), joka koskee IL-2:n läsnäoloa
ydinosassa, valossa vaihtoehtoinen toinen mielenkiintoinen mahdollisuus on,
10 että IL-2R β :n sytoplasmisen komponentin happamet sekä runsasproliiniset
alueet voivat ottaa osaan geneettisen ohjelmoinnin aktivoitumiseen. Ekspres-
siointisysteemin, jossa cDNA:n koodaama β -ketju voi antaa kasvusignaaleja,
saatavuus mahdollistaa reseptorin funktionaalisten alueiden selvittämisen
edelleen. Nyt on mahdollista tutkia IL-2:n oleellista roolia immuunijärjestelmän
15 kehittämisessä ja säätelyssä.

- Solupinnan reseptorin β -ketjun liukoisten vastineiden saatavuuden tulisi hel-
pottaa β -ketjun rakenneanalyysiä, koska liukoisten molekyylien kiteyttäminen
on helpompi toteuttaa kuin liukenemattomien. Liukoisia molekyyliä voidaan
20 myös käyttää varsinaisten solupinnan reseptoreiden neutraloimiseen tutkitta-
essa reseptorin biologisia toimintoja tai terapeuttisia tarkoituksia varten.

KIRJALLISUUSVIITEET

1. D.A. Morgan, F.W. Ruscelli, R.C. Gallo, *Science* 198, 1007 (1976)
2. X.A. Smith, *Annu.Rev.Immunol.* 2, 319 (1984); T. Taniguchi et al.,
5 *Immunol. Rev.* 92, 121 (1986)
3. D.H. Raulet, *Nature* 314, 101 (1985)
4. M. Tsudo, T. Uchiyama, H. Uchino, *J.Exp.Med.* 160, 612 (1984) ; T.A. Waldmann et al., *ibid.*, s. - 1450 (1984) ; M.A. Blackman, M.A. Tigges, M.E. Minis, M.E. Koshland, *Cell*, 47, 609 (1986)
- 10 5. M. Malkovsky et al., *Nature* 325, 262 (1987)
6. C.S. Henney, K. Kuribayashi, D.E. Kern, S. Gillis, *ibid.* 291, 335 (1981)
7. M.E. Lotze, E.A. Grimm, S.A. Strausser, S.A. Rosenberg, *Cancer Res.* 41, 4420 (1981); E.A. Grimm, A. Mazumder, H.Z. Zhang, S.A. Rosenberg, *J.Exp. Med.* 155, 1823 (1982)
- 15 8. S.A. Rosenberg et al., *N.Engl.J.Med.* 316, 889 (1987)
9. E.N. Benveniste, J.E. Merrill, *Nature* 321, 610 (1986)
10. S.J. LeGrue, *Lymphokine Res.* 7, 1987 (1988); G.B. Millis, P. Girard, S. Grinstein, E.W. Gelfand, *Cell* 55, 91 (1988); V.E. Valge, J.G.P. Wong, B.M. Datlof, A.J. Sinskey, A. Rao, *ibid.*, s. 101 (1988); M.A. Tigges, L.S. Casey, M.E. Koshland, *Science* 243, 781 (1989)
- 20 11. R.J. Robb, W.C. Greene, C.M. Rusk, *J.Exp.Med.* 160, 1126 (1984)
12. M. Tsudo, R.W. Kozak, C.K. Goldman, T.A. Waldmann, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S-a.* 83, 9694 (1986); K. Teshigawara, H.-M. Wang, K.Kato, K.A. Smith, *J.Exp.Med.* 165, 223 (1987)
- 25 13. W.J. Leonard et al., *Nature* 311, 626 (1984) T. Nikaido et al., *ibid.*, s. 631 (1984); D. Cosman et al., *ibid.* 312, 768 (1984)
14. M. Hatakeyama et al., *ibid.* 318, 467 (1985)
15. W.C. Greene et al., *J. Exp. Med.* 162, 363 (1985), S. Kondo et al., *ibid.* 320, 75 (1986); R.J. Robb, *Proc.Natl. Acad. Sci.U.S.A.* 83, 3992 (1986)
- 30 16. M. Sharon, R.D. Klausner, B.R. Cullen, R. Chizzonite, W.J. Leonard, *Science* 234, 859 (1986)

17. R.J. Robb et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., '84, 2002 (1987); M. Tsudo, R.W. Kozak, C.K. Goldman, T.A. Waldmann, *ibid.*, s-4215 (1987); M. Dukovich et al., *Nature* 327, 518 (1987)
18. M. Hatakeyama et al., *J.Exp.Med.* 166, 362 (1987); S. Kondo et al., *Nature* 327, 64 (1987)
19. M. Tsudo, F. Kitamura, M. Miyasaka, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. painossa
20. J. Yodoi et al., *J.Immunol.* 134, 1623 (1985)
21. B. Seed, A. Aruffo, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 84, 3365 (1987)f, B. Seed, *Nature* 328, 840 (1987)
22. D. Perlman, R.O. Halvorson, *J.Mol.Biol.* 167, 391 (1983); G. von Heijne, *Nucleic Acids Res.* 14, 4683 (1986)
23. A. Ullrich et al., *Nature* 309, 418 (1984); A. Ullrich et al., *ibid.* 313, 756 (1985); U. Ebina et al., *Cell* 40, 747 (1985)
24. L. Collins et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 85, 7709 (1988)
25. K.S. Hanks, A.N. Quinn, T. Hunter, *Science* 241, 42 (1988)
26. A. Alcover et al., *Immunol.Rev.* 95,5 (1987)
27. M. Hatakeyama, S. Minamoto, T. Taniguchi, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 83, 9650 (1986)
28. M. Hatakeyama, T. Doi, T. Kono, S. Minamoto, T. Taniguchi, *julkaisematomat havainnot*
29. J.D. Marth, R. Peet, E.G. Krebs, R.M. Perlmutter, *Cell* 43, 393 (1985)
30. R. Mann, R.C. Mulligan, D. Baltimore, *ibid.* 33, 153 (1983)
31. M. Fujii et al., *J.Exp.Med.* 163, 550 (1986)
32. A.M. Weissman et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 83, 1463 (1986)
33. R.J. Robb, W.C. Greene, *J.Exp.Med.* 165, 1201 (1987)
34. K. Sugamura et al., *ibid.* 161,1243 (1985)
35. H. Saragovi, T.R. Malek, *J.Immunol.* 141, 476 (1988)
36. J. Kyte, R.F. Daolittle, *J.Mol.Biol.* 157, 105 (1982)
37. H. Potter, L. Weir, P. Leder, Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 81, 7161 (1984)

Patenttivaatimukset

1. Rekombinantti-DNA-molekyyli, joka koodaa IL-2-reseptorin β -ketjua tai sen osaa, joka mainittu osa kykenee sitoutumaan IL-2:een.

5

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen rekombinantti-DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että se koodaa ihmisen tai hiiren IL-2-reseptorin β -ketjun tai sen osaa, joka mainittu osa kykenee sitoutumaan IL-2:een.

10 3. Rekombinantti-DNA-molekyyli, **tunnettu** rakennegeenistä, jolla on kaava:

													ATG
	GCG	GCC	CCT	GCT	CTG	TCC	TGG	CGT	CTG	CCC	CTC	CTC	ATC
	CTC	CTC	CTG	CCC	CTG	GCT	ACC	TCT	TGG	GCA	TCT	GCA	GCG
15	GTG	AAT	GGC	ACT	TCC	CAG	TTC	AGA	TGC	TTC	TAC	AAC	TCG
	AGA	GCC	AAC	ATC	TCC	TGT	CTC	TGG	AGC	CAA	GAT	GGG	GCT
	CTG	CAG	GAC	ACT	TCC	TGC	CAA	GTC	CAT	GCC	TGG	CCG	GAC
	AGA	CGG	CGG	TGG	AAC	CAA	ACC	TGT	GAG	CTG	CTC	CCC	GTG
	AGT	CAA	GCA	TCC	TGG	GCC	TGC	AAC	CTG	ATC	CTC	GGA	GCC
20	CCA	GAT	TCT	CAG	AAA	CTG	ACC	ACA	GTT	GAC	ATC	GTC	ACC
	CTG	AGG	GTG	CTG	TGC	CGT	GAG	GGG	GTG	CGA	TGG	AGG	GTG
	ATG	GCC	ATC	CAG	GAC	TTC	AAG	CCC	TTT	GAG	AAC	CTT	CGC
	CTG	ATG	GCC	CCC	ATC	TCC	CTC	CAA	GTT	GTC	CAC	GTG	GAG
	ACC	CAC	AGA	TGG	AAC	ATA	AGC	TGG	GAA	ATC	TCC	CAA	GCC
25	TCC	CAC	TAC	TTT	GAA	AGA	CAC	CTG	GAG	TTC	GAG	GCC	CGG
	ACG	CTG	TCC	CCA	GGC	CAC	ACC	TGG	GAG	GAG	GCC	CCC	CTG
	CTG	ACT	CTC	AAG	CAG	AAG	CAG	GAA	TGG	ATC	TGC	CTG	GAG
	ACG	CTC	ACC	CCA	GAC	ACC	CAG	TAT	GAG	TTT	CAG	GTG	CGG
	GTC	AAG	CCT	CTG	CAA	GGC	GAG	TTC	ACG	ACC	TGG	AGC	CCC
30	TGG	AGC	CAG	CCC	CTG	GCC	TTC	AGG	ACA	AAG	CCT	GCA	GCC
	CTT	GGG	AAG	GAC	ACC	ATT	CCG	TGG	CTC	GGC	CAC	CTC	CTC
	GTG	GGC	CTC	AGC	GGG	GCT	TTT	GGC	TTC	ATC	ATC	TTA	GTG
	TAC	TTG	CTG	ATC	AAC	TGC	AGG	AAC	ACC	GGG	CCA	TGG	CTG
	AAG	AAG	CTC	CTG	AAG	TGT	AAC	ACC	CCA	GAC	CCC	TCG	AAG
35	TTC	TTT	TCC	CAG	CTG	AGC	TCA	GAG	CAT	GGA	GGA	GAC	GTC

CAG AAG TGG CTC TCT TCG CCC TTC CCC TGA TCG TCC TTC
AGC CCT GGC GGC CTG GCA CCT GAG ATC TCG CCA CTA GAA
GTG CTG GAG AGG GAC AAG GTG ACG CAG CTG CTC CTG CAG
CAG GAC AAG GTG CCT GAG CCC GCA TCC TTA AGC AGC AAC
5 CAC TCG CTG ACC AGC TGC TTC ACC AAC CAG GGT TAC TTC
TTC TTC CAC CTC CCG GAT GCC TTG GAG ATA GAG GCC TGC
CAG GTG TAC TTT ACT TAC GAC CCC TAC TCA GAG GAA GAC
CCT GAT GAG GGT GTG GCC GGG GCA CCC ACA GGG TCT TCC
CCC CAA CCC CAT CAG CCT CTG TCA GGG GAG GAC GAC GCC
10 TAC TGC ACC TTC CCC TCC AGG GAT GAC CTG CTG CTC TTC
TCC CCC AGT CTC CTC GGT GGC CCC AGC CCC CCA AGC ACT
GCC CCT GGG GGC AGT GGG GCC GGT GAA GAG AGG ATG CCC
CCT TCT TTG CAA GAA AGA GTC CCC AGA GAC TGG GAC CCC
CAG CCC CTG GGG CCT CCC ACC CCA GGA GTC CCA GAC CTG
15 GTG GAT TTT CAG CCA CCC CCT GCG CTG GTG CTG CGA GAG
GCT GGG GAG GAG GTC CCT GAC GCT GGC CCC AGG GAG GGA
GTC AGT TTC CCC TGG TCC AGG CCT CCT GGG CAG GGG GAG
TTC AGG GCC CTT AAT GCT CGC CTG CCC CTG AAC ACT GAT
GCC TAC TTG TCC CTC CAA GAA CTC CAG GGT CAG GAC CCA
20 ATC CAC TTG GTG TAG

tai sen osa tai sen muunnos.

4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen rekombinantti-DAN-molekyyli, **tunnettu**
25 rakennegeenistä, jolla on kaava

GCT ACC ATA GCT CTT CCC TGG AGC CTG TCC CTC TAC GTC TTC CTC CTG CTC CTG GCT ACA CCT TGG GCA TCT GCA
 GCA GTG AAA AAC TGT TCC CAT CTT GAA TGC TTC TAC AAC TCA AGA GCC AAT GTC TCT TGC ATG TGG AGC CAT GAA
 GAG GCT CTG AAT GTC ACA ACC TGC CAC GTC CAT GCC AAG TCG AAC CAC CTG CGA CAC TGG AAC AAA ACC TGT GAG CTA
 ACT CTT GTG AGG CAG GCA TCC TGG GCC TGC AAC CTG ATC CTC GGG TCG TTC CCA GAG TCC CAG TCA CTG ACC TCC
 GTG GAC CTC CTT GAC ATA AAT GTG GTG TGC TGG GAA GAG AAG GGT TGG CGT AGG GTA AAG ACC TGC GAC TTC CAT
 CCC TTT GAC AAC CTT CGC CTG GTG GCC CTT CAT TCC CTC CAA GTT CTG CAC ATT GAT ACC CAG AGA TGT AAC ATA
 AGC TGG AAG GTC TCC CAG GTC TCT CAC TAC ATT GAA CCA TAC TTG GAA TTT GAG GCC CGT AGA CGT CTT CTG GGC
 CAC AGC TGG GAG GAT GCA TCC GTA TTA AGC CTC AAG CAG AGA CAG ACG TGG CTC TTC TTG GAG ATG CTG ATC CCT
 AGT ACC TCA TAT GAG GTC CAG GTG AGG GTC AAA GCT CAA CGA AAC AAT ACC GGG ACC TGG AGT CCC TGG AGC CAG
 CCC CTG ACC TTT CGG ACA AGG CCA GCA GAT CCC ATG AAG GAG ATC CTC CCC ATG TCA TGG CTC AGA TAC CTT CTG
 CTG GTC CTT GGT TGT TTT TCT GGC TTC TTC TCC TGC GTC TAC ATT TTG GTC AAG XXX CGG TAC CTT GGG CCA TGG
 CTG AAG ACA GTT CTC AAG TGC CAC ATC CCA GAT CCT TCT GAG TTC TTC TCC CAG CTG AGC TCC CAG CAT GGG GGA
 GAC CTT CAG AAA TGG CTC TCC TCG CCT GTC CCC TTG TCC TTC AGC CCC AGT GGC CCT GGC CCT GAG ATC TCT
 CCG CTG GAA GTG CTC GAC GGA GAT TCC AAG GCC GTG CAG CTG CTC CTG TTA CAG AAG GAC TCT GCC CCT TTA CCC
 TCG CCC AGC GGC CAC TCA CAG GCC AGC TGC TTC ACC AAC CAG GGC TAC TTC TTC CAT CTG CCC AAT GCC TTG
 GAG ATC GAA TCC TGC CAG GTG TAC TTC ACC TAT GAC CCC TGT GTG GAA GAG GTG GAG GAT GGG TCA AGG
 CTG CCC GAG GGA TCT CCC CAC CCA CCT CTG CTG CCT CTG GCT GGA GAA CAG GAT GAC TAC TGT GCC TTC CCG CCC
 AGG GAT GAC CTG CTG CTC TTC TCC CCG AGC CTC AGC ACC CCC AAC ACT GCC TAT GGG GGC AGC AGA GCC CCT GAA
 GAA AGA TCT CCA CTC TCC CTG CAT GAG GGA CTT CCC TCC CTA GCA TCC CGT GAC CTG ATC GGC TTA CAG CGC CCT
 CTG GAG CGG ATG CCG GAA GGT GAT GGA GAG GGG CTG TCT GCC AAT AGC TCT GGG GAG CAG GCC AGT GTC CCA GAA
 GGC AAC CTT CAT GGG CAA GAT CAG GAC AGA GGC CAG GGC CCC ATC CTG ACC CTG AAC ACC GAT GCC TAT CTG TCT
 CTT CAA GAA CTA CAG GCC CAA GAT TCA GTC CAC CTA ATA TAG ***

XXX = GGC tai TGC

tai sen osa tai sen degeneroitu muunnos.

5. Rekombinantti-DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että se muodostuu jonkin seuraavien plasmidien

5

plasmidi:	talletusnumero:
pIL-2R β 6,	FERM BP-2312
pIL-2R β 9,	FERM BP-2313
pIL-2R β 19,	FERM BP-2314
10 pIL-2R β 30,	FERM BP-2315
pMIL-2R β 36,	FERM BP-2435

DNA-insertistä, joka koodaa IL-2R β :a tai sen osaa, joka mainittu osa kykenee sitoutumaan IL-2:een.

15

6. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 5 mukainen rekombinantti-DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että se koodaa koko IL-2-R β -ketjun tai sen muunnoksen liukoista osaa, joka mainittu osa kykenee sitoutumaan IL-2:een.

20 7. Patenttivaatimuksen 6 mukainen rekombinantti-DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että se koodaa ihmisen IL-2R β -ketjun aminohappoja noin 1 - noin 210.

8. Patenttivaatimuksen 7 mukainen rekombinantti-DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että terminaaliset nukleotidit ovat seuraavat

25 GCC CTT GCT AGC TAG

ja että se koodaa ihmisen vesiliukoisen IL-2R β -ketjun johdosta.

9. Rekombinantti-DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että se erittäin stringenteissä olosuhteissa kykenee hybridisoitumaan jossakin edellä olevassa patenttivaatimuksessa määritellyn rekombinantti-DNA:n kanssa ja että se koodaa patenttivaatimuksen 6 mukaista proteiinia, jolla on IL-2R β -ketjun aktiivisuus, tai sen osaa, joka mainittu osa kykenee sitoutumaan IL-2:een.

30

10. Jonkin patenttivaatimuksen 1 - 9 mukainen rekombinantti-DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että se edelleen käsittää säätelysekvenssejä, jotka on toiminnallisesti kytketty IL-2R β -ketjun tai sen osan, joka mainittu osa kykenee sitoutumaan IL-2:een, rakennegeeniin.

5

11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen rekombinantti-DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että se on plasmidi.

	12.	Plasmidi:	talletusnumero:
10		pIL-2R β 6,	FERM BP-2312
		pIL-2R β 9,	FERM BP-2313
		pIL-2R β 19,	FERM BP-2314
		pIL-2R β 30,	FERM BP-2315
		pMIL-2R β 36,	FERM BP-2435

15

13. Isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että se on transformoitu jonkin patenttivaatimuksen 10 - 12 mukaisella rekombinantti-DNA-molekyyllillä.

14. Patenttivaatimuksen 13 mukainen isäntäsolu, **tunnettu** siitä, että se on bakteerisolun tai hiivasolun tai nisäkässolun.

15. Menetelmä proteiinin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että sopiva isäntäorganismi transformoidaan ekspressoitavaksi vektorilla, joka sisältää sopivassa ekspressoitavakohdassa haluttua polypeptidiä koodaavan jonkin patenttivaatimuksen 1 - 9 mukaisen sekvenssin, ja eristetään haluttu proteiini saaduista transformanteista.

16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen menetelmä, **tunnettu** siitä, että käytetty ekspressoitavavektori on jonkin patenttivaatimuksen 10 - 12 mukainen.

30

17. Menetelmä patenttivaatimuksen 13 tai 14 mukaisen isäntäorganismin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että jonkin patenttivaatimuksen 10 - 12 mukainen vektori transformoidaan sopivan isännän kanssa.

18. Menetelmä jonkin patenttivaatimuksen 10 - 12 mukaisen vektorin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että jonkin patenttivaatimuksen 1 - 9 mukainen DNA-sekvenssi insertoidaan sopivaan vektoriin.

Patentkrav

1. Rekombinant-DNA-molekyl, som kodar en IL-2-receptors β -kedja eller dess del, vilken nämnda del förmår binda vid IL-2.

5

2. Rekombinant-DNA-molekyl enligt patentkravet 1, **kännetecknad** därav, att den kodar en mänskas eller mus IL-2-receptors β -kedja eller dess del, vilken nämnda del förmår binda vid IL-2.

10 3. Rekombinant-DNA-molekyl, **kännetecknad** av en byggnadsgen med formeln:

													ATG
	GCG	GCC	CCT	GCT	CTG	TCC	TGG	CGT	CTG	CCC	CTC	CTC	ATC
15	CTC	CTC	CTG	CCC	CTG	GCT	ACC	TCT	TGG	GCA	TCT	GCA	GCG
	GTG	AAT	GGC	ACT	TCC	CAG	TTC	AGA	TGC	TTC	TAC	AAC	TCG
	AGA	GCC	AAC	ATC	TCC	TGT	CTC	TGG	AGC	CAA	GAT	GGG	GCT
	CTG	CAG	GAC	ACT	TCC	TGC	CAA	GTC	CAT	GCC	TGG	CCG	GAC
	AGA	CGG	CGG	TGG	AAC	CAA	ACC	TGT	GAG	CTG	CTC	CCC	GTG
20	AGT	CAA	GCA	TCC	TGG	GCC	TGC	AAC	CTG	ATC	CTC	GGA	GCC
	CCA	GAT	TCT	CAG	AAA	CTG	ACC	ACA	GTT	GAC	ATC	GTC	ACC
	CTG	AGG	GTG	CTG	TGC	CGT	GAG	GGG	GTG	CGA	TGG	AGG	GTG
	ATG	GCC	ATC	CAG	GAC	TTC	AAG	CCC	TTT	GAG	AAC	CTT	CGC
	CTG	ATG	GCC	CCC	ATC	TCC	CTC	CAA	GTT	GTC	CAC	GTG	GAG
25	ACC	CAC	AGA	TGG	AAC	ATA	AGC	TGG	GAA	ATC	TCC	CAA	GCC
	TCC	CAC	TAC	TTT	GAA	AGA	CAC	CTG	GAG	TTC	GAG	GCC	CGG
	ACG	CTG	TCC	CCA	GGC	CAC	ACC	TGG	GAG	GAG	GCC	CCC	CTG
	CTG	ACT	CTC	AAG	CAG	AAG	CAG	GAA	TGG	ATC	TGC	CTG	GAG
	ACG	CTC	ACC	CCA	GAC	ACC	CAG	TAT	GAG	TTT	CAG	GTG	CGG
30	GTC	AAG	CCT	CTG	CAA	GGC	GAG	TTC	ACG	ACC	TGG	AGC	CCC
	TGG	AGC	CAG	CCC	CTG	GCC	TTC	AGG	ACA	AAG	CCT	GCA	GCC
	CTT	GGG	AAG	GAC	ACC	ATT	CCG	TGG	CTC	GGC	CAC	CTC	CTC
	GTG	GGC	CTC	AGC	GGG	GCT	TTT	GGC	TTC	ATC	ATC	TTA	GTG
	TAC	TTG	CTG	ATC	AAC	TGC	AGG	AAC	ACC	GGG	CCA	TGG	CTG
35	AAG	AAG	CTC	CTG	AAG	TGT	AAC	ACC	CCA	GAC	CCC	TCG	AAG

```

TTC TTT TCC CAG CTG AGC TCA GAG CAT GGA GGA GAC GTC
CAG AAG TGG CTC TCT TCG CCC TTC CCC TGA TCG TCC TTC
AGC CCT GGC GGC CTG GCA CCT GAG ATC TCG CCA CTA GAA
GTG CTG GAG AGG GAC AAG GTG ACG CAG CTG CTC CTG CAG
5 CAG GAC AAG GTG CCT GAG CCC GCA TCC TTA AGC AGC AAC
CAC TCG CTG ACC AGC TGC TTC ACC AAC CAG GGT TAC TTC
TTC TTC CAC CTC CCG GAT GCC TTG GAG ATA GAG GCC TGC
CAG GTG TAC TTT ACT TAC GAC CCC TAC TCA GAG GAA GAC
CCT GAT GAG GGT GTG GCC GGG GCA CCC ACA GGG TCT TCC
10 CCC CAA CCC CAT CAG CCT CTG TCA GGG GAG GAC GAC GCC
TAC TGC ACC TTC CCC TCC AGG GAT GAC CTG CTG CTC TTC
TCC CCC AGT CTC CTC GGT GGC CCC AGC CCC CCA AGC ACT
GCC CCT GGG GGC AGT GGG GCC GGT GAA GAG AGG ATG CCC
CCT TCT TTG CAA GAA AGA GTC CCC AGA GAC TGG GAC CCC
15 CAG CCC CTG GGG CCT CCC ACC CCA GGA GTC CCA GAC CTG
GTG GAT TTT CAG CCA CCC CCT GCG CTG GTG CTG CGA GAG
GCT GGG GAG GAG GTC CCT GAC GCT GGC CCC AGG GAG GGA
GTC AGT TTC CCC TGG TCC AGG CCT CCT GGG CAG GGG GAG
TTC AGG GCC CTT AAT GCT CGC CTG CCC CTG AAC ACT GAT
20 GCC TAC TTG TCC CTC CAA GAA CTC CAG GGT CAG GAC CCA
ATC CAC TTG GTG TAG

```

eller dess del eller dess variant.

- 25 4. Rekombinant-DNA-molekyl enligt patentkravet 1, **kännetecknad** av en byggnadsgen med formeln kaava

...

..

:

ATG
GCT ACC ATA GCT CTT CCC TGG AGC CTG TCC CTC TAC GTC TTC CTC CTG CTC CTG GCT ACA CCT TGG GCA TCT GCA
GCA GTG AAA AAC TGT TCC CAT CTT GAA TGC TTC TAC AAC TCA AGA GCC AAT GTC TCT TGC ATG TGG AGC CAT GAA
GAG GCT CTG AAT GTC ACA ACC TGC CAC GTC CAT GCC AAG TCG AAC CTG CGA CAC TGG AAC AAA ACC TGT GAG CTA
ACT CTT GTG AGG CAG GCA TCC TGG GCC TGC AAC CTG ATC CTC GGG TCG TTC CCA GAG TCC CAG TCA CTG ACC TCC
GTG GAC CTC CTT GAC ATA AAT GTG GTG TGC TGG GAA GAG AAG GGT TGG CGT AGG GTA AAG ACC TGC GAC TTC CAT
CCC TTT GAC AAC CTT CGC CTG GTG GCC CCT CAT TCC CTC CAA GTT CTG CAC ATT GAT ACC CAG AGA TGT AAC ATA
AGC TGG AAG GTC TCC CAG GTC TCT CAC TTA AGC CTC AAG CAG AGA CAG TGG GAA TTT GAG GCC CGT AGA CGT CTT CTG GGC
CAC AGC TGG GAG GAT GCA TCC GTA TTA AGC CTC AAG CAG AGA CAG ACG TGG CTC TTC TTG GAG ATG CTG ATC CCT
AGT ACC TCA TAT GAG GTC CAG GTG AGG GTC AAA GCT CAA CGA AAC AAT ACC GGG ACC TGG AGT CCC TGG AGC CAG
CCC CTG ACC TTT CGG ACA AGG CCA GCA GAT CCC ATG AAG GAG ATC CTC CCC ATG TCA TGG CTC AGA TAC CTT CTG
CTG GTC CTT GGT TGT TTT TCT GGC TTC TTC TCC TGC GTC TAC ATT TTG GTC AAG XXX CGG TAC CTT GGG CCA TGG
CTG AAG ACA GTT CTC AAG TGC CAC ATC CCA GAT CCT TCT GAG TTC TTC TCC CAG CTG AGC TCC CAG CAT GGG GGA
GAC CTT CAG AAA TGG CTC TCC TCG CCT GTC CCC TTG TCC TTC AGC CCC AGT GGC CCT GGC CCT GAG ATC TCT
CCG CTG GAA GTG CTC GAC GGA GAT TCC AAG GCC GTG CAG CTG CTC CTG TTA CAG AAG GAC TCT GCC CCT TTA CCC
TCG CCC AGC GGC CAC TCA CAG GCC AGC TGC TTC ACC AAC CAG GGC TAC TTC TTC CAT CTG CCC AAT GCC TTG
GAG ATC GAA TCC TGC CAG GTG TAC TTC ACC TAT GAC CCC TGT GTG GAA GAG GTG GAG GAT GGG TCA AGG
CTG CCC GAG GGA TCT CCC CAC CCA CCT CTG CTG CCT CTG GCT GGA GAA CAG GAT GAC TAC TGT GCC TTC CCG CCC
AGG GAT GAC CTG CTG CTC TTC TCC CCG AGC CTC AGC ACC CCC AAC ACT GCC TAT GGG GGC AGC AGA GCC CCT GAA
GAA AGA TCT CCA CTC TCC CTG CAT GAG GGA CTT CCC TCC CTA GCA TCC CGT GAC CTG ATC GGC TTA CAG CGC CCT
CTG GAG CGG ATG CCG GAA GGT GAT GGA GAG GGG CTG TCT GCC AAT AGC TCT GGG GAG CAG GCC AGT GTC CCA GAA
GGC AAC CTT CAT GGG CAA GAT CAG GAC AGA GGC CAG GGC CCC ATC CTG ACC CTG AAC ACC GAT GCC TAT CTG TCT
CTT CAA GAA CTA CAG GCC CAA GAT TCA GTC CAC CTA ATA TAG ***

XXX = GGC tai TGC

eller dess del eller dess degenererade variant.

5. Rekombinant-DNA-molekyl, **kännetecknad** därav, att den består av en DNA-insert av någon av följande plasmider

5

plasmid:	depositionsnummer:
pIL-2R β 6,	FERM BP-2312
pIL-2R β 9,	FERM BP-2313
pIL-2R β 19,	FERM BP-2314
pIL-2R β 30,	FERM BP-2315
pMIL-2R β 36,	FERM BP-2435

10

som kodar IL-2R β eller dess del, vilken nämnda del förmår binda vid IL-2.

15 6. Rekombinant-DNA-molekyl enligt något av patentkraven 1 - 5, **kännetecknad** därav, att den kodar hela IL-2-R β -kedjan eller dess variants lösliga del, vilken nämnda del förmår binda vid IL-2.

20 7. Rekombinant-DNA-molekyl enligt patentkravet 6, **kännetecknad** därav, att den kodar människans IL-2R β -kedjas aminosyror ca 1 - ca 210.

8. Rekombinant-DNA-molekyl enligt patentkravet 7, **kännetecknad** därav, att de terminala nukleotiderna är följande
GCC CTT GCT AGC TAG

25 och att den kodar ett vattenlösligt derivat till en human IL-2R β -kedja.

9. Rekombinant-DNA-molekyl, **kännetecknad** därav, att den i synnerligen stringenta förhållanden förmår hybridisera med en rekombinant-DNA definierade i något av föregående patentkrav och att den kodar ett protein enligt patentkravet 6 med en IL-2R β -kedjas aktivitet, eller dess del, vilken nämnda del förmår binda vid IL-2.

30

10. Rekombinant-DNA-molekyl enligt något av patentkraven 1 - 9, **kännetecknad** därav, att den därtill omfattar reglersekvenser, som funktionellt är kopplade till byggnadsgenen i IL-2R β -kedjan eller dess del, vilken nämnda del förmår binda vid IL-2.

5

11. Rekombinant-DNA-molekyl enligt patentkravet 10, **kännetecknad** därav, att den är en plasmidi.

	12.	Plasmid:	depositionsnummer:
10		pIL-2R β 6,	FERM BP-2312
		pIL-2R β 9,	FERM BP-2313
		pIL-2R β 19,	FERM BP-2314
		pIL-2R β 30,	FERM BP-2315
		pMIL-2R β 36,	FERM BP-2435

15

13. Vårdcell, **kännetecknad** därav, att den är transformerad med en rekombinant-DNA-molekyl enligt något av patentkraven 10 - 12.

14. Vårdcell enligt patentkravet 13, **kännetecknad** därav, att den är en bakteriecell eller jästcell eller däggdjurscell.

20

15. Förfarande för framställning av protein, **kännetecknat** därav, att en lämplig värdorganism transformeras med en expressionsvektor, som innehåller en i en lämplig expressionsposition den önskade polypeptiden kodande sekvens enligt något av patentkraven 1 - 9, och det önskade proteinet separeras från den erhållna transformanten.

25

16. Förfarande enligt patentkravet 15, **kännetecknat** därav, att den använda expressionsvektorn är en enligt något av patentkraven 10 - 12.

30

17. Förfarande för framställning av en värdorganism enligt patentkravet 13 eller 14, **kännetecknat** därav, att en vektor enligt något av patentkraven 10 - 12 transformeras med en lämplig värd.

..

18. Förfarande för framställning av en vektor enligt något av patentkraven 10 - 12, **kännetecknat** därav, att en DNA-sekvens enligt något av patentkraven 1 - 9 inserteras i en lämplig vektor.

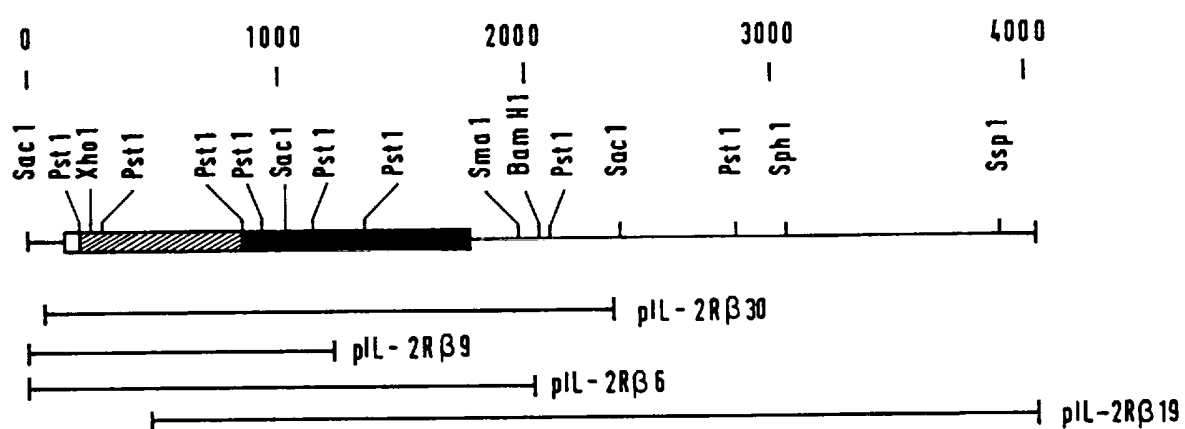


FIG. 1a

FIG. 1B

Sivu 1)		GCAGCCAGAGCTCAGCAGGGCCCTGGAGAGATGG												34	
		CCACGGTCCCAGCACCGGGGAGGACTGGAGAGCGCGCGCTGCCACCGCCCC													
		ATGTCTCAGCCAGGGCTTCCTTCCTCGGCTCCACCCTGTGGATGTA												134	
														ATG Met -26	
-25		GCG	GCC	CCT	GCT	CTG	TCC	TGG	CGT	CTG	CCC	CTC	CTC	ATC	173
		Ala	Ala	Pro	Ala	Leu	Ser	Trp	Arg	Leu	Pro	Leu	Leu	Ile	
-12		CTC	CTC	CTG	CCC	CTG	GCT	ACC	TCT	TGG	GCA	TCT	GCA	GCG	212
		Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Ala	Thr	Ser	Trp	Ala	Ser	Ala	Ala	
2		GTG	AAT	GGC	ACT	TCC	CAG	TTC	AGA	TGC	TTC	TAC	AAC	TCG	251
		Val	Asn	Gly	Thr	Ser	Gln	Phe	Thr	Cys	Phe	Tyr	Asn	Ser	
15		AGA	GCC	AAC	ATC	TCC	TGT	CTC	TGG	AGC	CAA	GAT	GGG	GCT	290
		Arg	Ala	Asn	Ile	Ser	Cys	Val	Trp	Ser	Gln	Asp	Gly	Ala	
28		CTG	CAG	GAC	ACT	TCC	TGC	CAA	GTC	CAT	GCC	TGG	CCG	GAC	329
		Leu	Gln	Asp	Thr	Ser	Cys	Gln	Val	His	Ala	Trp	Pro	Asp	
41		AGA	CGG	CGG	TGG	AAC	CAA	ACC	TGT	GAG	CTG	CTC	CCC	GTG	368
		Arg	Arg	Arg	Trp	Asn	Gln	Thr	Cys	Glu	Leu	Leu	Pro	Val	
54		AGT	CAA	GCA	TCC	TGG	GCC	TGC	AAC	CTG	ATC	CTC	GGA	GCC	407
		Ser	Gln	Ala	Ser	Trp	Ala	Cys	Asn	Leu	Ile	Leu	Gly	Ala	
67		CCA	GAT	TCT	CAG	AAA	CTG	ACC	ACA	GTT	GAC	ATC	GTC	ACC	446
		Pro	Asp	Ser	Gln	Lys	Leu	Thr	Thr	Val	Asp	Ile	Val	Thr	
80		CTG	AGG	GTG	CTG	TGC	CGT	GAG	GGG	GTG	CGA	TGG	AGG	GTG	485
		Leu	Arg	Val	Leu	Cys	Arg	Glu	Gly	Val	Arg	Trp	Arg	Val	
93		ATG	GCC	ATC	CAG	GAC	TTC	AAG	CCC	TTT	GAG	AAC	CTT	CGC	524
		Met	Ala	Ile	Gln	Asp	Phe	Lys	Pro	Phe	Glu	Asn	Leu	Arg	
106		CTG	ATG	GCC	CCC	ATC	TCC	CTC	CAA	GTT	GTC	CAC	GTG	GAG	563
		Leu	Met	Ala	Pro	Ile	Ser	Leu	Gln	Val	Val	His	Val	Glu	
119		ACC	CAC	AGA	TGG	AAC	ATA	AGC	TGG	GAA	ATC	TCC	CAA	GCC	602
		Thr	His	Arg	Cys	Asn	Ile	Ser	Trp	Glu	Ile	Ser	Gln	Ala	
132		TCC	CAC	TAC	TTT	GAA	AGA	CAC	CTG	GAG	TTC	GAG	GCC	CGG	641
		Ser	His	Tyr	Phe	Glu	Arg	His	Leu	Glu	Phe	Glu	Ala	Arg	
145		ACG	CTG	TCC	CCA	GGC	CAC	ACC	TGG	GAG	GAG	GCC	CCC	CTG	680
		Thr	Leu	Ser	Pro	Gly	His	Thr	Trp	Glu	Glu	Ala	Pro	Leu	

FIG. 1B

Sivu 2)

158	CTG	ACT	CTC	AAG	CAG	AAG	CAG	GAA	TGG	ATC	TGC	CTG	GAG	719
	Leu	Thr	Leu	Lys	Gln	Lys	Gln	Glu	Trp	Ile	Cys	Leu	Glu	
171	ACG	CTC	ACC	CCA	GAC	ACC	CAG	TAT	GAG	TTT	CAG	GTG	CGG	758
	Thr	Leu	Thr	Pro	Asp	Thr	Gln	Tyr	Glu	Phe	Gln	Val	Arg	
184	GTC	AAG	CCT	CTG	CAA	GGC	GAG	TTC	ACG	ACC	TGG	AGC	CCC	797
	Val	Lys	Pro	Leu	Gln	Gly	Glu	Phe	Thr	Thr	Trp	Ser	Pro	
197	TGG	AGC	CAG	CCC	CTG	GCC	TTC	AGG	ACA	AAG	CCT	GCA	GCC	836
	Trp	Ser	Gln	Pro	Leu	Ala	Phe	Arg	Thr	Lys	Pro	Ala	Ala	
210	CTT	GGG	AAG	GAC	ACC	ATT	CCG	TGG	CTC	GGC	CAC	CTC	CTC	875
	Leu	Gly	Lys	Asp	Thr	Ile	Pro	Trp	Leu	Gly	His	Leu	Leu	
223	GTG	GGC	CTC	AGC	GGG	GCT	TTT	GGC	TTC	ATC	ATC	TTA	GTG	914
	Val	Gly	Leu	Ser	Gly	Ala	Phe	Gly	Phe	Ile	Ile	Leu	Val	
236	TAC	TTG	CTG	ATC	AAC	TGC	AGG	AAC	ACC	GGG	CCA	TGG	CTG	953
	Tyr	Leu	Leu	Ile	Asn	Cys	Arg	Asn	Thr	Gly	Pro	Trp	Leu	
249	AAG	AAG	CTC	CTG	AAG	TGT	AAC	ACC	CCA	GAC	CCC	TCG	AAG	992
	Lys	Lys	Val	Leu	Lys	Cys	Asn	Thr	Pro	Asp	Pro	Ser	Lys	
262	TTC	TTT	TCC	CAG	CTG	AGC	TCA	GAG	CAT	GGA	GGA	GAC	GTC	1031
	Phe	Phe	Ser	Gln	Leu	Ser	Ser	Glu	His	Gly	Gly	Asp	Val	
275	CAG	AAG	TGG	CTC	TCT	TCG	CCC	TTC	CCC	TGA	TCG	TCC	TTC	1070
	Gln	Lys	Trp	Leu	Ser	Ser	Pro	Phe	Pro	Ser	Ser	Ser	Phe	
288	AGC	CCT	GGC	GGC	CTG	GCA	CCT	GAG	ATC	TCG	CCA	CTA	GAA	1109
	Ser	Pro	Gly	Gly	Leu	Ala	Pro	Glu	Ile	Ser	Pro	Leu	Glu	
301	GTG	CTG	GAG	AGG	GAC	AAG	GTG	ACG	CAG	CTG	CTC	CTG	CAG	1148
	Val	Leu	Glu	Arg	Asp	Lys	Val	Thr	Gln	Leu	Leu	Leu	Gln	
314	CAG	GAC	AAG	GTG	CCT	GAG	CCC	GCA	TCC	TTA	AGC	AGC	AAC	1187
	Gln	Asp	Lys	Val	Pro	Glu	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Ser	Asn	
327	CAC	TCG	CTG	ACC	AGC	TGC	TTC	ACC	AAC	CAG	GGT	TAC	TTC	1226
	His	Ser	Leu	Thr	Ser	Cys	Phe	Thr	Asn	Gln	Gly	Tyr	Phe	
340	TTC	TTC	CAC	CTC	CCG	GAT	GCC	TTG	GAG	ATA	GAG	GCC	TGC	1265
	Phe	Phe	His	Leu	Pro	Asp	Ala	Leu	Glu	Ile	Glu	Ala	Cys	
353	CAG	GTG	TAC	TTT	ACT	TAC	GAC	CCC	TAC	TCA	GAG	GAA	GAC	1304
	Gln	Val	Tyr	Phe	Thr	Tyr	Asp	Pro	Tyr	Ser	Glu	Glu	Asp	
366	CCT	GAT	GAG	GGT	GTG	GCC	GGG	GCA	CCC	ACA	GGG	TCT	TCC	1343
	Pro	Asp	Glu	Gly	Val	Ala	Gly	Ala	Pro	Thr	Gly	Ser	Ser	
379	CCC	CAA	CCC	CTG	CAG	CCT	CTG	TCA	GGG	GAG	GAC	GAC	GCC	1382
	Pro	Gln	Pro	Leu	Gln	Pro	Leu	Ser	Gly	Glu	Asp	Asp	Ala	

FIG. 1B

Sivu 3)

392	TAC TGC ACC TTC CCC TCC AGG GAT GAC CTG CTG CTC TTC	1421
	Tyr Cys Thr Phe Pro Ser Arg Asp Asp Leu Leu Leu Phe	
405	TCC CCC AGT CTC CTC GGT GGC CCC AGC CCC CCA AGC ACT	1460
	Ser Pro Ser Leu Leu Gly Gly Pro Ser Pro Pro Ser Thr	
418	GCC CCT GGG GGC AGT GGG GCC GGT GAA GAG AGG ATG CCC	1499
	Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ala Gly Glu Glu Arg Met Pro	
431	CCT TCT TTG CAA GAA AGA GTC CCC AGA GAC TGG GAC CCC	1538
	Pro Ser Leu Gln Glu Arg Val Pro Arg Asp Trp Asp Pro	
444	CAG CCC CTG GGG CCT CCC ACC CCA GGA GTC CCA GAC CTG	1577
	Gln Pro Leu Gly Pro Pro Thr Pro Gly Val Pro Asp Leu	
457	GTG GAT TTT CAG CCA CCC CCT GAG CTG GTG CTG CGA GAG	1616
	Val Asp Phe Gln Pro Pro Pro Glu Leu Val Leu Arg Glu	
470	GCT GGG GAG GAG GTC CCT GAC GCT GGC CCC AGG GAG GGA	1655
	Ala Gly Glu Glu Val Pro Asp Ala Gly Pro Arg Glu Gly	
483	GTC AGT TTC CCC TGG TCC AGG CCT CCT GGG CAG GGG GAG	1694
	Val Ser Phe Pro Trp Ser Arg Pro Pro Gly Gln Gly Glu	
496	TTC AGG GCC CTT AAT GCT CGC CTG CCC CTG AAC ACT GAT	1733
	Phe Arg Ala Leu Asn Ala Arg Leu Pro Leu Asn Thr Asp	
509	GCC TAC TTG TCC CTC CAA GAA CTC CAG GGT CAG GAC CCA	1772
	Ala Tyr Leu Ser Leu Gln Glu Leu Gln Gly Gln Asp Pro	
522	ATC CAC TTG GTG TAG ACAGATGGCCAGGGTGGGAGGCAGGCAGCT	1817
	Thr His Leu Val ***	

GCCTGCTCTGCGCCGAGCCTCAGAAGGACCCTGTTGAGGGTCCTCAGTCCA
 CTGCTGAGGACACTCAGTGTCCAGTTGCAGCTGGACTTCTCCACCCGGATG
 GCCCCACCCAGTCCTGCACACTTGGTCCATCCATTTCCAAACCTCCACTG
 CTGCTCCCGGGTCCTGCTGCCCCGAGCCAGGAAGTGTGTGTGTTGCAGGGGG
 GCAGTAACTCCCCAACTCCCTCGTTAATCACAGGATCCCACGAATTTAGGC
 TCAGAAGCATCGCTCCTCTCCAGCCCTGCAGCTATTCACCAATATCAGTCC
 TCGCGGCTCTCCAGGGCTCCCTGCCCTGACCTCTTCCCTGGGTTTTCTGCC
 CCAGCCTCCTCCTTCCCTCCCCCTCCCCGTCCACAGGGCAGCCTGAGCGTGC
 TTTCCAAAACCCAAATATGGCCACGCTCCCCCTCGGTTCAAAACCTTGAC
 AGGTCCCACTGCCCTCAGCCCCACTTCTCAGCCTGGTACTTGACCTCCGG
 TGTCGTGTGGGGACATCCCCTTCTGCAATCCTCCCTACCGTCCTCCCGAGC
 CACTCAGAGCTCCCTCACACCCCCTCTGTTGCACATGCTATTCCCTGGGGC
 TGCTGTGCGCTCCCCCTCATCTAGGTGACAAACTTCCCTGACTCTTCAAGT

FIG. 1B

Sivu 4)

GCCGGTTTTGCTTCTCCTGGAGGGAAGCACTGCCTCCCTTAATCTGCCAGA
AACTTCTAGCGTCAGTGCTGGAGGGAGAAGCTGTCAGGGACCCAGGGCGCC
TGGAGAAAGAGGCCCTGTTACTATTCTTTGGGATCTCTGAGGCCTCAGAG
TGCTTGGCTGCTGTATCTTTAATGCTGGGGCCCAAGTAAGGGCACAGATCC
CCCCGACAAAGTGGATGCCTGCTGCATCTTCCCACAGTGGCTTCACAGACC
CACAAGAGAAGCTGATGGGGAGTAAACCCTGGAGTCCGAGGCCAGGCAGC
AGCCCCGCCTAGTGGTGGGCCCTGATGCTGCCAGGCCTGGGACCTCCCACT
GCCCCCTCCACTGGAGGGGTCTCCTCTGCAGCTCAGGGACTGGCACACTGG
CCTCCAGAAGGGCAGCTCCACAGGGCAGGGCCTCATTATTTTTCTACTGCCC
CAGACACAGTGCCCAACACCCCGTCGTATACCCTGGATGAACGAATTAATT
ACCTGGCACCACCTCGTCTGGGCTCCCTGCGCCTGACATTCACACAGAGAG
GCAGAGTCCCGTGCCCATTAGGTCTGGCATGCCCCCTCCTGCAAGGGGCTC
AACCCCTACCCCGACCCCTCCACGTATCTTTCCTAGGCAGATCACGTTGC
AATGGCTCAAACAACATTCCACCCCAGCAGGACAGTGACCCAGTCCCAGC
TAACTCTGACCTGGGAGCCCTCAGGCACCTGCACTTACAGGCCTTGCTCAC
AGCTGATTGGGCACCTGACCACACGCCCCACAGGCTCTGACCAGCAGCCT
ATGAGGGGGTTTTGGCACCAAGCTCTGTCCAATCAGGTAGGCTGGGCCTGAA
CTAGCCAATCAGATCAACTCTGTCTTGGGCGTTTGAATCAGGGAGGGAGG
CCCTTGGGAGCAGGTGCTTGTGGACAAGGCTCCACAAGCGTTGAGCCTTG
AAAGGTAGACAAGCGTTGAGCCACTAAGCAGAGGACCTTGGGTTCCCAATA
CAAAAATACCTACTGCTGAGAGGGCTGCTGACCATTTGGTCAGGATTCTCTG
TTGCCTTTATATCCAAAATAAACTCCCCTTTCTTGAGGTTGTCTGAGTCTT
GGGTCTATGCCTTGAAAAAAGCTGAATTATTGGACAGTCTCACCTCCTGCC
ATAGGGTCTGAATGTTTCAGACCACAAGGGGCTCCACACCTTTGCTGTGT
GTTCTGGGGCAACCTACTAATCCTCTCTGCAAGTCGGTCTCCTTATCCCCC
CAAATGGAAATTGTATTTGCCTTCTCCACTTTGGGAGGCTCCCACTTCTTG
GGAGGGTTACATTTTTTAAGTCTTAATCATTTGTGACATATGTATCTATAC
ATCCGTATCTTTTAATGATCCGTGTGTACCATCTTTGTGATTATTTCTTA
ATATTTTTTCTTTAAGTCAGTTCATTTTCGTTGAAATACATTTATAAGAA
AAATCTTTGTTACTCTGTAAATGAAAAAACCATTTTCGCTATAAATAAAA
GGTAACTGTACAAAATAAGTACAAT

FIG. 2

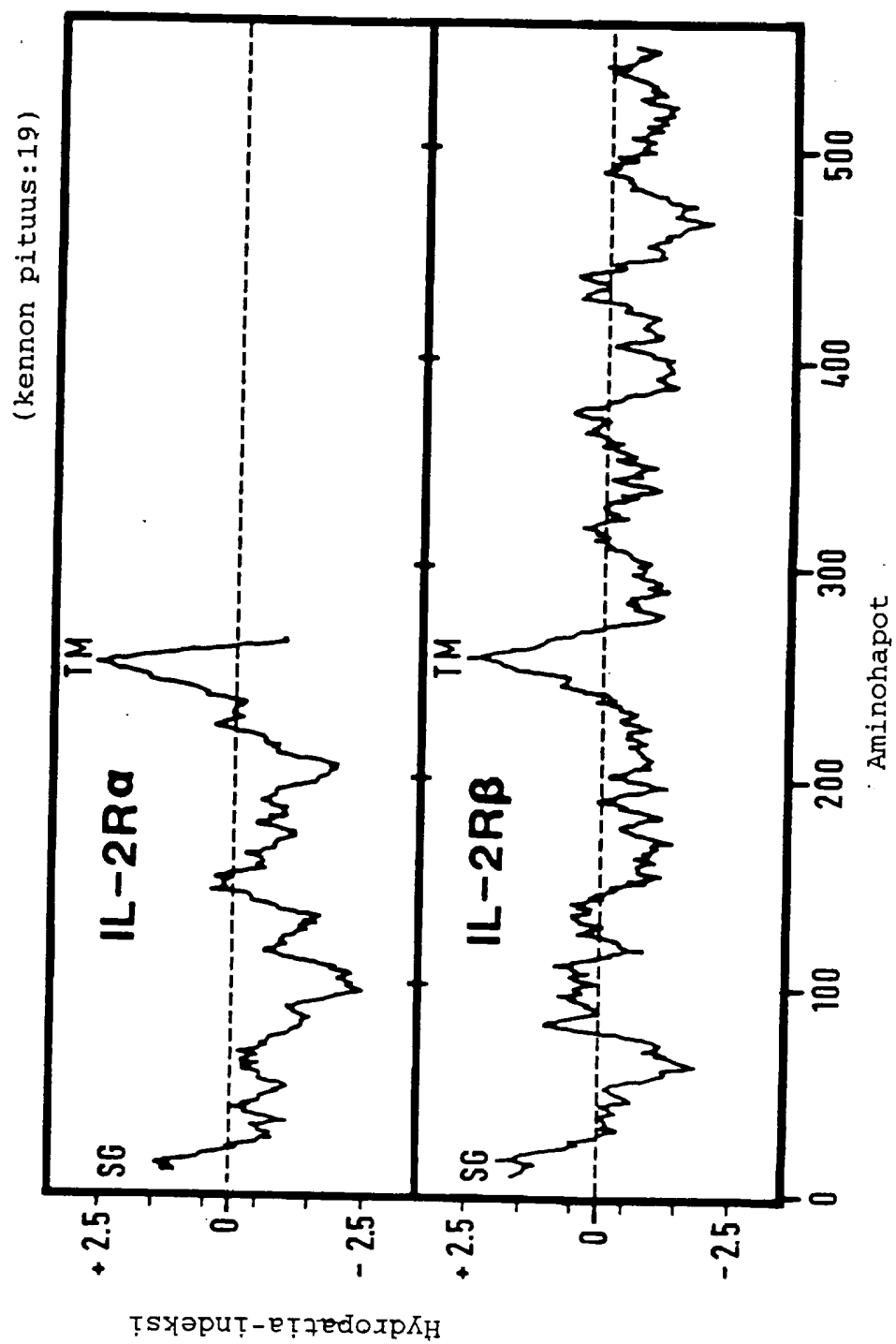


FIG. 3a

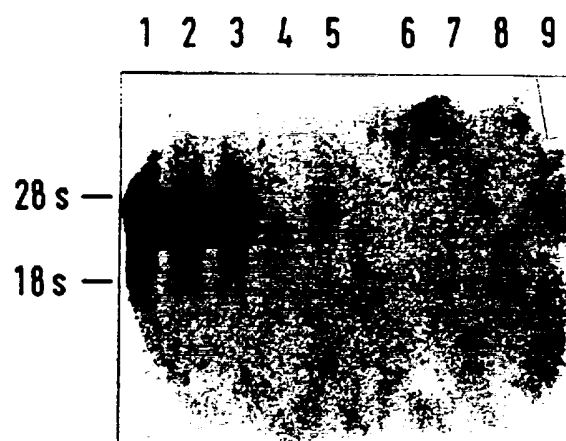


FIG. 3b

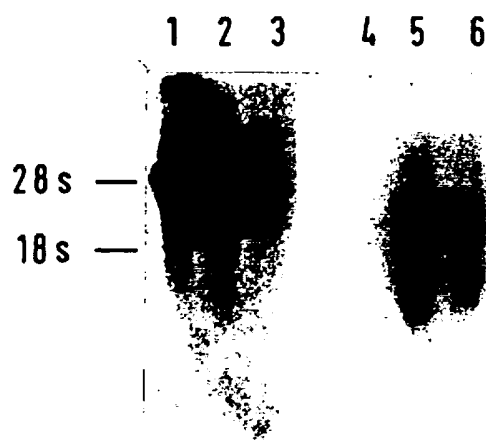
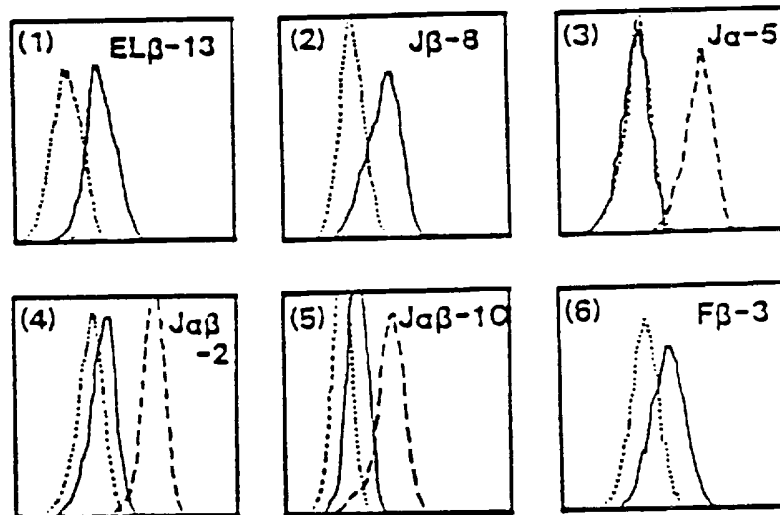


FIG. 4a



Suhteellinen fluoresenssi-intensiteetti (log-asteikko)

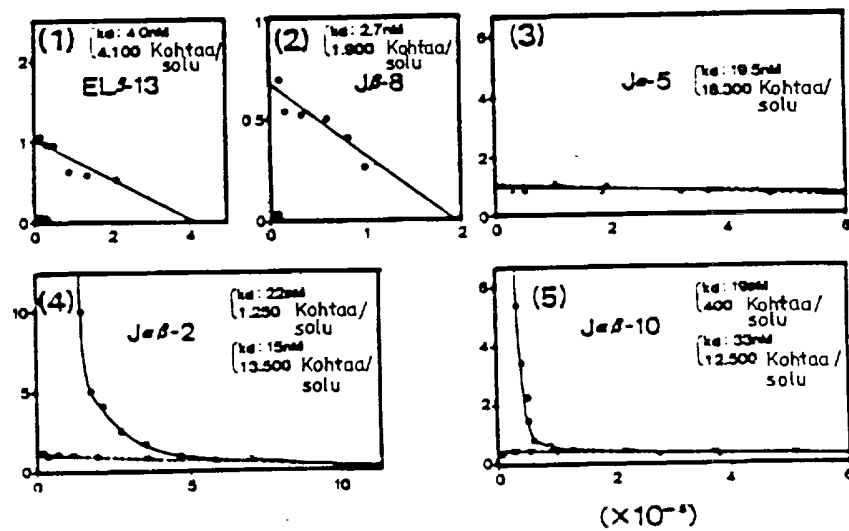


FIG. 4b

FIG. 5

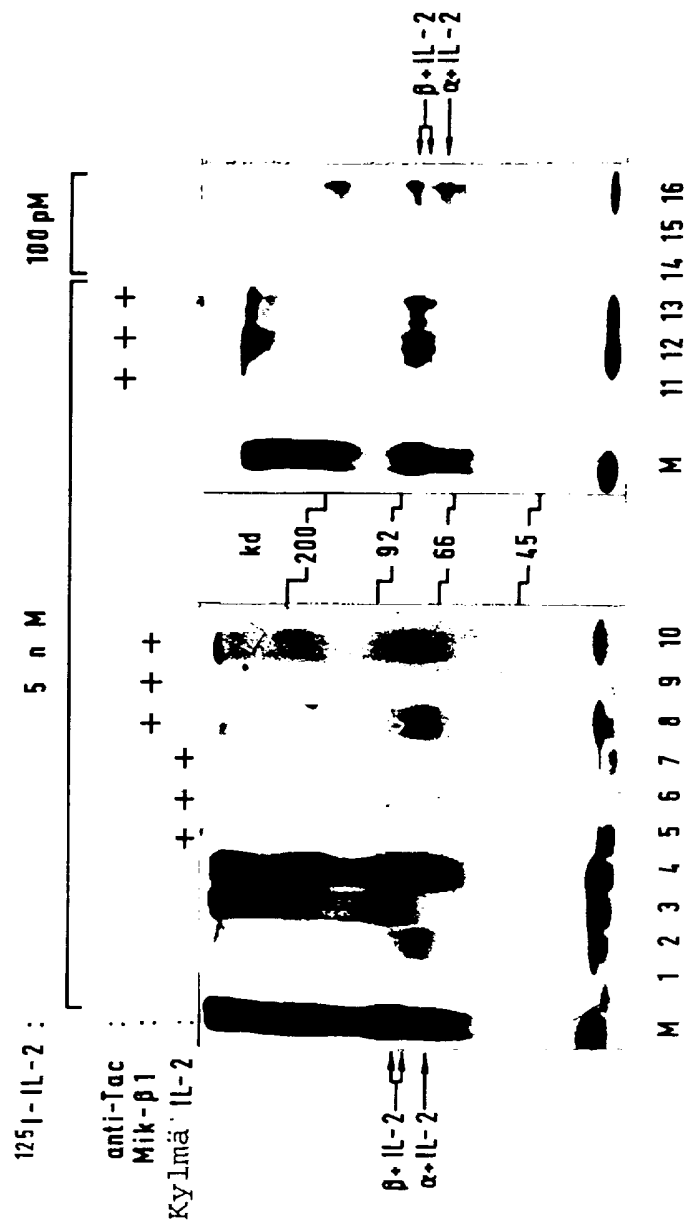
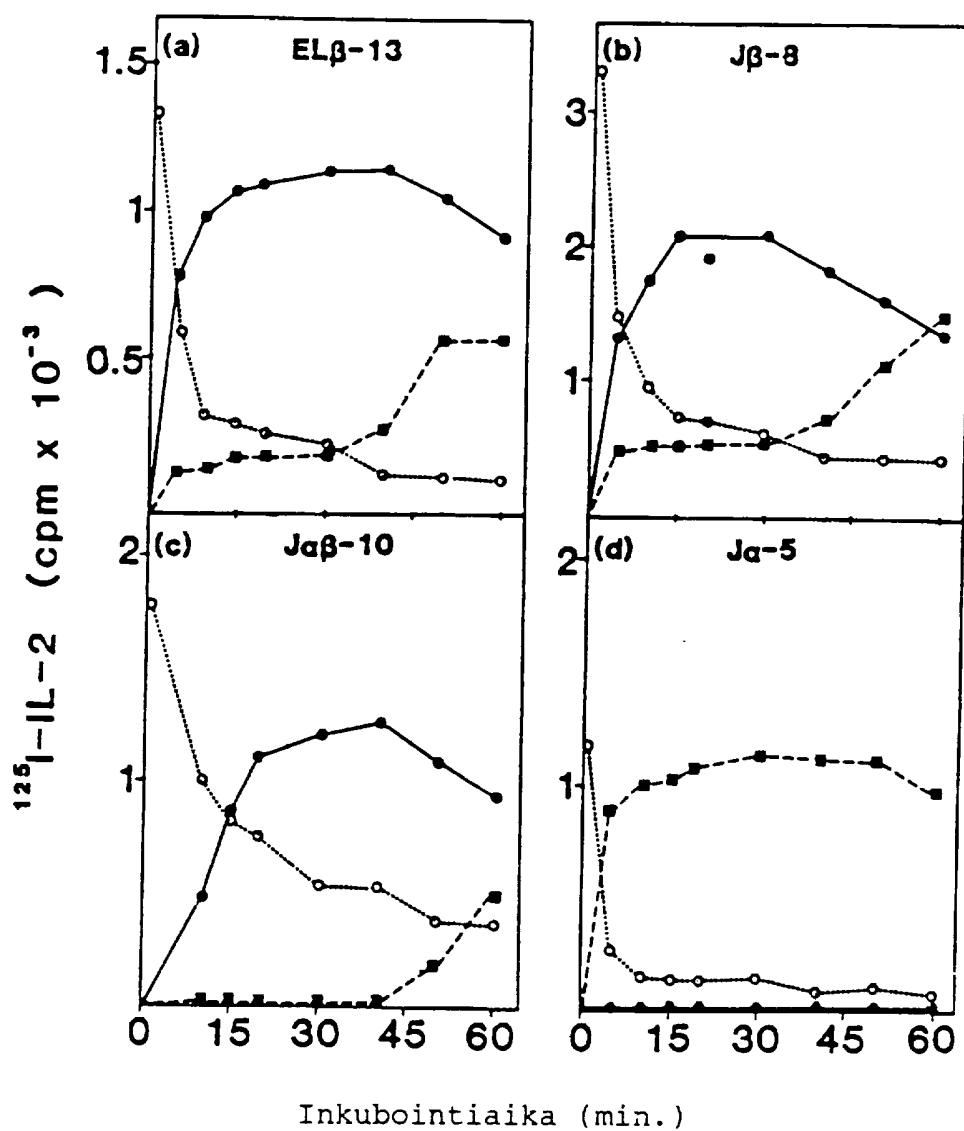


FIG. 6



Hilren IL-2-reseptorin β -ketjun cDNA-kloonin
restriktioentsymykartta

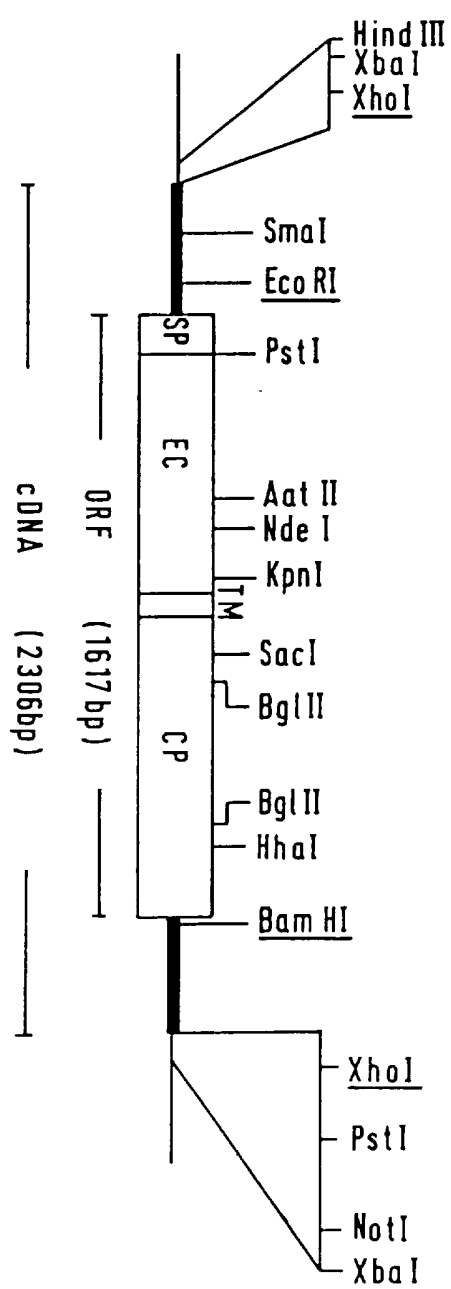


FIG. 7

CGTTTTCTCICICICITGCTTCTTGCCICICITGCTTCTTACACGCTTGCTCCTGAAGATGTAAGAAATAAAGCTTTGCCGCA
 82
 GAAGATTCTGGTCTGTGTTCTTCCCTGGCCGGTCTGTGAGAACCGGICICIAATAACAATTGGTGCCGAACCCGGGACGAGAAAAAATCTGGGACGAGA
 181
 GTTTACATCACCGGTGCAAGGAAGATCCCTCATCTCCAGAACAGAACATGCGGGTTCGGGTAAATAAAGGTTCCCGTAAAGCAGACTGTTAAGAAGGATTC
 280
 AACTGTATGAATTCAGAACTTTTCAGCTGGGGAACGAGAGATCCAGTGTACAGCTTTACGAGGGTTTGACATCCTCAGCTCCCTCAGCTGTG ATG
 377 Met

GCT ACC ATA GCT CTT CCC TGG AGC CTG TCC CTC TAC GTC TTC CTC CTG CTC CTG GCT ACA CCT TGG GCA TCT GCA
 452 Ala Thr Ile Ala Leu Pro Trp Ser Leu Ser Leu Tyr Val Phe Leu Leu Leu Ala Thr Pro Trp Ala Ser Ala

GCA GTG AAA AAC TGT TCC CAT CTT GAA TGC TTC TAC AAC TCA AGA GCC AAT GTC TCT TGC ATG TGG AGC CAT GAA
 527 Ala Val Lys Asn Cys Ser His Leu Glu Cys Phe Tyr Asn Ser Arg Ala Asn Val Ser Cys Met Trp Ser His Glu

GAG GCT CTG AAT GTC ACA ACC TGC CAC GTC CAT GCC AAG TCG AAC CTG CGA CAC TGG AAC AAA ACC TGT GAG CTA
 602 Glu Ala Leu Asn Val Thr Thr Cys His Val His Ala Lys Ser Asn Leu Arg His Trp Asn Lys Thr Cys Glu Leu

ACT CTT GTG AGG CAG GCA TCC TGG GCC TGC AAC CTG ATC CTC GGG TCG TTC CCA GAG TCC CAG TCA CTG ACC TCC
 677 Thr Leu Val Arg Gln Ala Ser Trp Ala Cys Asn Leu Ile Leu Gly Ser Phe Pro Glu Ser Gln Ser Leu Thr Ser

GTG GAC CTC CTT GAC ATA AAT GTG GTG TGC TGG GAA GAG AAG GGT TGG CGT AGG GTA AAG ACC TGC GAC TTC CAT
 752 Val Asp Leu Leu Asp Ile Asn Val Val Cys Trp Glu Glu Lys Gly Trp Arg Arg Val Lys Thr Cys Asp Phe His

CCC TTT GAC AAC CTT CGC CTG GTG GCC CCT CAT TCC CTC CAA GTT CTG CAC ATT GAT ACC CAG AGA TGT AAC ATA
 827 Pro Phe Asp Asn Leu Arg Leu Val Ala Pro His Ser Leu Gln Val Leu His Ile Asp Thr Gln Arg Cys Asn Ile

AGC TGG AAG GTC TCC CAG GTC TCT CAC TAC ATT GAA CCA TAC TTG GAA TTT GAG GCC CGT AGA CGT CTT CTG GGC
 902 Ser Trp Lys Val Ser Gln Val Ser His Tyr Ile Glu Pro Tyr Leu Glu Phe Glu Ala Arg Arg Arg Leu Leu Gly

CAC AGC TGG GAG GAT GCA TCC GTA TTA AGC CTC AAG CAG AGA CAG ACG TGG CTC TTC TTG GAG ATG CTG ATC CCT
 977 His Ser Trp Glu Asp Ala Ser Val Leu Ser Leu Lys Gln Arg Gln Gln Trp Leu Phe Leu Glu Met Leu Ile Pro

AGT ACC TCA TAT GAG GTC CAG GTG AGG GTC AAA GCT CAA CGA AAC AAT ACC GGG ACC TGG AGT CCC TGG AGC CAG
 1052 Ser Thr Ser Tyr Glu Val Gln Val Arg Val Arg Val Lys Ala Gln Arg Asn Asn Thr Gly Thr Trp Ser Pro Trp Ser Gln

CCC CTG ACC TTT OGG ACA AGG CCA GCA GAT CCC ATG AAG GAG ATC CTC CCC ATG TCA TGG CTC AGA TAC CTT CTG
 1127 Pro Leu Thr Phe Arg Thr Arg Pro Ala Asp Pro Met Lys Glu Ile Leu Pro Met Ser Trp Leu Arg Tyr Leu Leu

CTG GTC CTT GGT TGT TTT ICT GGC TTC TCC TGC GTC TAC ATT TTG GTC AAG XXX CGG TAC CTT GGG CCA TGG
 1202 Leu Val Leu Glu Gly Cas Phe Ser Gly Phe Phe Ser Cys Val Tyr Ile Leu Val Lys Y Arg Tyr Leu Gly Pro Trp

FIG. 8

251	CTG AAG ACA GTT CTC AAG TGC CAC ATC CCA GAT CCT TCT GAG TTC TTC TCC CAG CTG AGC TCC CAG CAT GGG GGA Leu Lys Thr Val Leu Lys Cys His Ile Pro Asp Pro Ser Ser Glu Phe Phe Ser Gln Leu Ser Ser Gln His Gly Gly	1277
276	GAC CTT CAG AAA TGG CTC TCC TCG CCT GTC CCC TTG TCC TTC TTC AGC CCC AGT GGC CCT GCC CCT GAG ATC TCT Asp Leu Gln Lys Trp Leu Ser Ser Pro Val Pro Leu Ser Phe Phe Ser Pro Ser Gly Pro Ala Pro Glu Ile Ser	1352
301	CCG CTG GAA GTG CTC GAC GGA GAT TCC AAG GCC GTG CAG CTG CTC CTG TTA CAG AAG GAC TCT GCC CCT TTA CCC Pro Leu Glu Val Leu Asp Gly Asp Ser Lys Ala Val Gln Leu Leu Leu Lys Asp Ser Ala Pro Leu Pro	1427
326	TCG CCC AGC GGC CAC TCA CAG GCC AGC TGC TTC ACC AAC CAG GGC TAC TTC TTC CAT CTG CCC AAT GCC TTG Ser Pro Ser Ser Gly His Ser Gln Ala Ser Cys Phe Thr Asn Gln Gly Tyr Phe Phe Phe His Leu Pro Asn Ala Leu	1502
351	GAG ATC GAA TCC TGC CAG GTG TAC TTC ACC TAT GAC CCC TGT GTG GAA GAG GTG GAG GAG GAT GGG TCA AGG Glu Ile Glu Ser Cys Gln Val Tyr Phe Thr Tyr Asp Pro Cys Val Glu Glu Val Glu Asp Gly Ser Arg	1577
376	CTG CCC GAG GGA TCT CCC CAC CCA CCT CTG CTG CCT CTG GCT GGA GAA CAG GAT GAC TAC TGT GCC TTC CCG CCC Leu Pro Glu Gly Ser Pro His Pro Pro Leu Leu Leu Pro Leu Ala Gly Glu Gln Asp Asp Tyr Cys Ala Phe Pro Pro	1652
401	AGG GAT GAC CTG CTG CTC TCC CCG AGC CTC AGC ACC CCC AAC ACT GCC TAT GGG GGC AGC AGA GCC CCT GAA Arg Asp Asp Leu Leu Leu Phe Ser Pro Ser Ser Leu Ser Thr Pro Asn Thr Ala Tyr Gly Gly Ser Arg Ala Pro Glu	1727
426	GAA AGA TCT CCA CTC TCC CAT GAG GGA CTT CCC TCC CTA GCA TCC CGT GAC CTG ATG GGC TTA CAG CGC CCT Glu Arg Ser Pro Leu Ser Leu Ser His Glu Gly Leu Leu Ser Ser Arg Asp Leu Met Gly Leu Gln Arg Pro	1802
451	CTG GAG CGG ATG CCG GAA GGT GAT GGA GAG GGG CTG TCT GCC AAT AGC TCT GGG GAG CAG GCC AGT GTC CCA GAA Leu Glu Arg Met Pro Glu Gly Asp Gly Leu Ser Ser Ser Ser Gly Glu Gln Ala Ser Val Pro Glu	1877
476	GGC AAC CTT CAT GGG CAA GAT CAG GAC AGA GGC CAG GGC CCC ATC CTG ACC CTG AAC ACC GAT GCC TAT CTG TCT Gly Asn Leu His Gly Gln Asp Gln Asp Arg Gly Gln Gly Pro Ile Leu Thr Leu Asn Thr Asp Ala Tyr Leu Ser	1952
501	CTT CAA GAA CTA CAG GCC CAA GAT TCA GTC CAC CTA ATA TAG CAGGTGGCCAGGACTGGGATCCAGCTGCCTGGATCAGGTCAG Leu Gln Glu Leu Gln Ala Gln Asp Ser Val His Leu Ile ***	2036
	GCTTGAGGAAGACTGCTTAAGAGGGTCTCTTGAGGACAGTCCACIGCTGAGGACTGTCTGGCTATCCCTGCCCCCCCCCTCCAAACTTAATCATCCACT TCTGAACCTCCATTGCTACTTCTCGTGGTCTAACCCAGGGTTTGGTGGAGGTTGGGAGTGGGGAGCGGTGGTCAGCTCCCACTGCCCTATTAGTCATGAG GTCAC TAGCTTCTGTACCTGCTCTTCCCTCTCTGCTTGCCTTCACAGGGCAGCTAGAACTTGCTTCCCG	2135 2234 2306

XXX = GGC tai TGC

Y = Gly tai Cys

FIG. 8

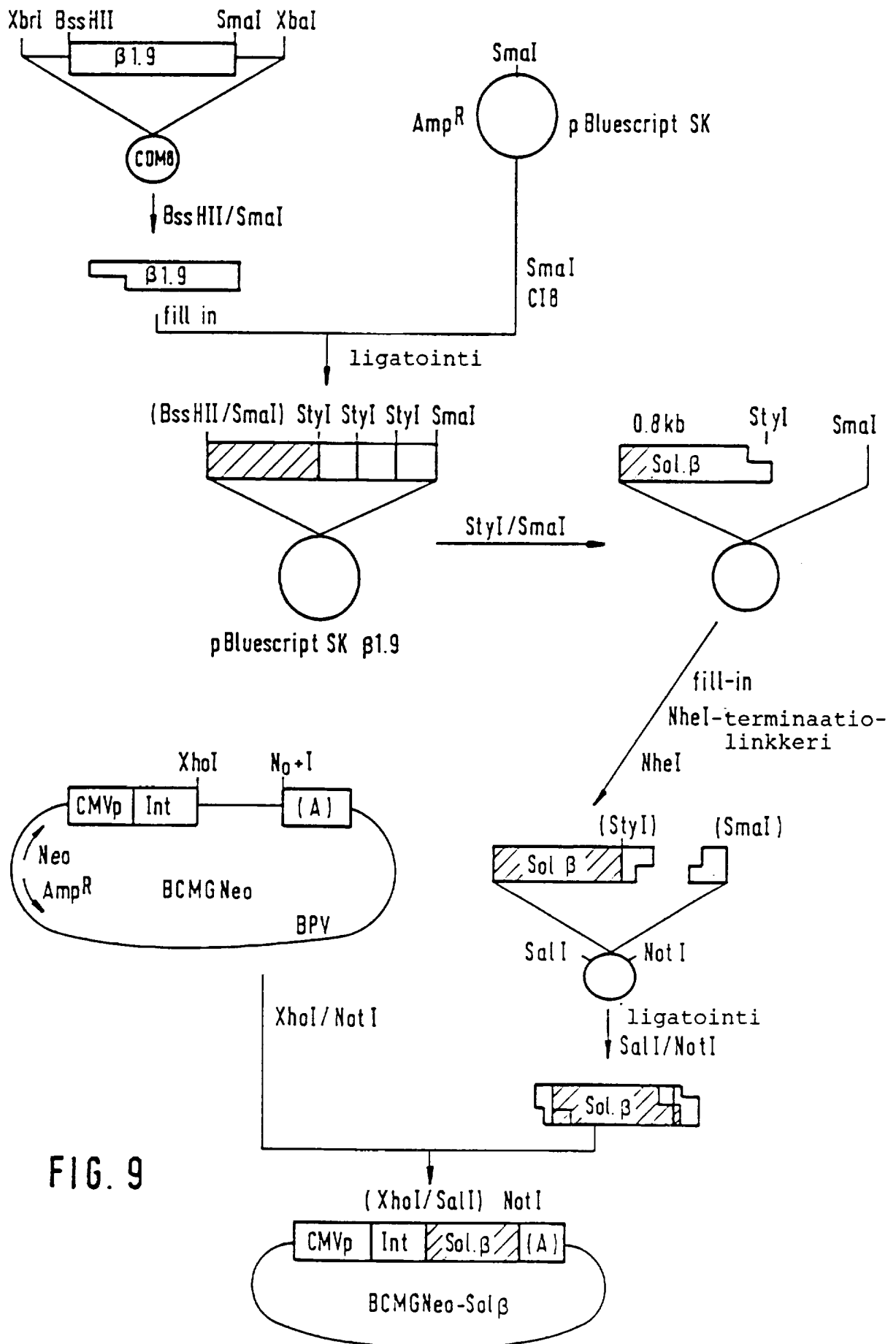
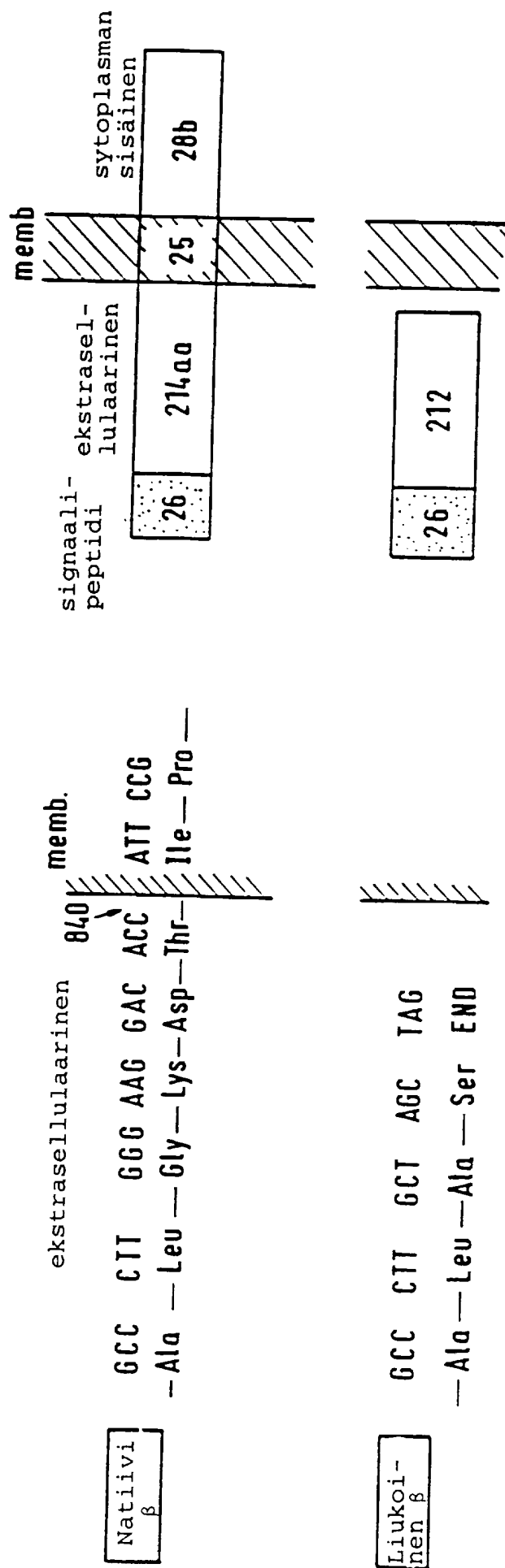


FIG. 9

FIG. 10



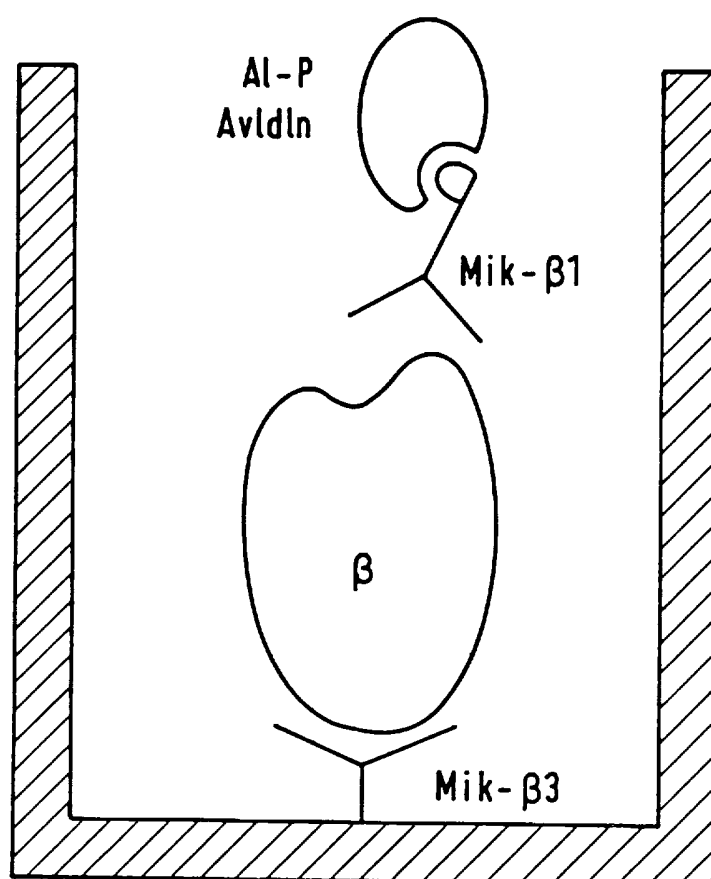


FIG. 11

Liukoinen β
 ^{35}S -meth-leimaus

2 μl 4 μl 8 μl

$\text{Mr} \times 10^{-3}$

69 —

46 —

30 —

— 37KD

FIG. 12

1 mik- β 1 2 upc 10 3 mik- β 1 4 upc 10 5 mik- β 1 6 upc 10

Absorbanssi 405 nm

FIG. 13

