(19) DANMARK (11) **DK 175865 B1**

(12) PATENTSKRIFT

Patent- og
Varemærkestyrelsen

(51) Int.Cl⁷.: **C 12 N 15/24** **A 61 K 38/00** **A 61 K 39/395** **C 12 P 21/02** **C 12 P 21/08**
G 01 N 33/577

(21) Patentansøgning nr: **PA 1989 03020**

(22) Indleveringsdag: **1989-06-19**

(24) Løbedag: **1988-10-19**

(41) Alm. tilgængelig: **1989-06-19**

(45) Patentets meddelelse bkg. den: **2005-04-18**

(86) International ansøgning nr: **PCT/US88/03747**

(86) International indleveringsdag: **1988-10-19**

(85) Videreførelsesdag: **1989-06-19**

(30) Prioritet: **1987-10-26 US 113566**

(73) Patenthaver: **Sanofi - Aventis, 174 Avenue de France, FR 75013 Paris, Frankrig**

(72) Opfinder: **Anthony E. Namen, 3228 48th Avenue Southwest, Seattle, Washington 98116, USA**
Raymond G. Goodwin, 3322 8th Avenue West, Seattle, Washington 98119, USA
Stephen D. Lupton, 520 Summit Avenue East Apt. 202, Seattle, Washington 98102, USA
Diane Y. Mochizuki, 4805 Stanford Avenue Northeast, Seattle, Washington 98105, USA
Virginia L. Price, 2617 Boyer Avenue East, Seattle, Washington 98102, USA
Michael C. Deeley, 8830 233rd Place Soutwest, Edmonds, Washington 98020, USA

(74) Fuldmægtig: **Budde, Schou & Ostenfeld A/S, Vester Søgade 10, 1601 København V, Danmark**

(54) Benævnelse: **Interleukin-7**

(56) Fremdragne publikationer:
Ingen

(57) Sammendrag:

Mammale interleukin-7 proteiner (IL-7'er), DNA'er og ekspressionsvektorer, der indkoder mammale IL-7'er, og fremgangsmåder til fremstilling af mammale IL-7'er som produkter af cellekultur, inklusive rekombinante systemer, beskrives.

fortsættes

Den foreliggende opfindelse vedrører generelt områderne immunologi og molekylærbiologi og i særdeleshed en polypeptidvækstfaktor, der regulerer proliferationen og differentieringen af lymfocyt- og andre hæmatopoietiske stamformer.

B- og T-lymfocytter er immunresponsernes primære effektorceller. Begge celleklasser anses for i sidste instans at stamme fra hæmatopoietiske stamceller i mammal knoglemarv, via stamform- eller prækursorceller, der repræsenterer skelnelige stadier i differentieringen af hver klasse.

B-lymfocytter eller B-celler er prækursorer for cirkulerende antistof-udskillende plasmaceller. Modne B-celler, som er karakteriseret ved ekspression af overfladebundet immunglobulin, som er i stand til at binde specifikke antigener, stammer fra hæmatopoietiske stamceller via en mellemliggende celleklasse, der er kendt som præ-B-celler. Modne T-celler udvikles hovedsageligt i thymus, antageligt ud fra en endnu uidentificeret prækursorcelle, der på et tidligt trin af T-lymfocytudviklingen emigrerer fra knoglemarven til thymus.

Mens der er sket betydelige fremskridt med hensyn til indentifikationen af opløselige hormonlignende faktorer, der regulerer differentieringen af andre celler af hæmatopoietisk oprindelse, fx. granulocytter og makrofager, vides der ikke meget om de i B- og T-cellelymfogenese involverede regulatoriske faktorer. Den pluripotente lymfoide stamcelle er ikke blevet identificeret, og heller ikke alle de faktorer eller betingelser, der kræves til anvendelse og ekspansion af B- og T-celleslægterne, er blevet defineret. De senere stadier af B- og T-cellevækst og -differentiering, der følger efter forekomsten af overfladeimmunglobulin og fremkomsten af B-cellen fra knoglemarven eller af T-cellen fra thymus, er blevet bedst undersøgte. Dette arbejde har afsløret et antal faktorer, som påvirker modne perifere B- og T-celler, inklusive IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, interferon gamma, BSF-2, neuroleukin og den transformerende vækstfaktor beta.

Fragmentarisk bevismateriale med hensyn til B-cellerne, der anses for at være de umiddelbare prækursorer for modne funktionelle perifere B-celler, er blevet tilgængeligt. Disse præ-B-celler er blevet defineret som celler, der indeholder en cytoplasmatisk μ-kæde, men ingen cytoplasmatisk let kæde og intet overfladeimmunglobulin.

Paige, Nature 302:711 (1983) og Paige et al., Eur. J. Immunol. 14:979 (1984) beskriver teknikker til dyrkning af B-celle-stamformer

hidrørende fra leverceller fra 14 dage gamle musefostre. Det iagttoges, at disse præ-B-celler differentierede til antistof-udskillende B-celler in vitro, når kulturer næredes med et lag af føtale leverceller, knoglemarvs-adhærente celler eller konditionerede medier indeholdende kolonistimulerende faktorer.

Giri et al., J. Immunol. 132:223 (1984) dyrkede en fra murin knoglemarv stammende præ-B-cellelinie, 70Z/3, i nærvær af delvist oprensede IL-1 præparater stammende fra lipopolysaccharid (LPS) -inducerede P388D1-cellesupernatanter. Efter kontakt med IL-1-præparatet blev det iagttaget, at præ-B-cellerne udtrykte overfladeimmunglobulin. Jyonouchi et al., J. Immunol. 135:1891 (1985) rapporterede, at en eller flere humorale faktorer fra serumet fra NZB-mus var i stand til at forøge modningen af prækursorer af B-celleslægt. Landreth et al., J. Immunol. 134:2305 (1985) påviste, at en faktor (eller faktorer), som var til stede i urinen fra en cyklisk neutropen patient, stimulerede dannelsen af præ-B-celler i humane og murine knoglemarvskulturer.

Det har imidlertid været vanskeligt at fortolke disse resultater p.g.a. den ikke-homogene natur af de involverede cellepopulationer. De pleiotrope virkninger af kendte lymfokiner samt deres potente iboende biologiske aktiviteter vanskeliggør analysen af assays, der involverer responsen af heterogene cellekulturer over for konditionerede cellekulturmedier stammende fra serumholdige cellekulturer.

En større hindring for undersøgelsen af lymfocytudvikling har været den vanskelighed, som er forbundet med at opnå berigede populationer af levedygtige lymfoidprækursorer. Gennem det af Whitlock og Witte, J. Immunol. Meth. 67:353 (1984), udviklede langtids-knoglemarvskultursystem blev der tilvejebragt en kilde for præ-B-celler til undersøgelse. I en Whitlock-Witte kultur anvendes et adhærent støttelag omfattende fra stroma stammende fibroblaster, makrofager og endothelialceller som fødelag til støtte for væksten af en øvre fase af ikke-adhærente præ-B- og tidligere lymfoidprækursorer.

Whitlock et al., Cell 48:1009 (1987), og Hunt et al., Cell 48:997 (1987), rapporterede kloning af cellelinier stammende fra murin knoglemarvsstroma, hvilke cellelinier var i stand til at støtte væksten af præ-B-celler og andre prækursorer af modne B-celler i Whitlock-Witte kulturer. Supernatanter fra en sådan cellelinie, betegnet ALC, blev testet for aktivitet ved IL-1, IL-2, IL-3 og IL-4 assays. Fravær af aktivitet ved disse assays lod formode, at disse faktorer ikke var kilden

for den proliferations-inducerende aktivitet, der findes i ALC-supernatanter. Både Whitlock et al. og Hunt et al. tog den præ-B-celle inducerende aktivitet, som ifølge deres iagttagelser må tilskrives en hidtil ukendt faktor, som er til stede i stromacellesupernatanterne, med i deres overvejelser.

Under udviklingen af den foreliggende opfindelse anvendtes en variant af Whitlock-Witte kultursystemet som en kilde for umodne B-celler, der dannede basis for en hurtig kvantitativ assay til påvisning af vækstfaktorer, som var i stand til at stimulere proliferation af præ-B-celler. En formodet faktor, der iagttoges i murine stromacellekulturer, betegnedes forsøgsvis "lymfopoietin-1" ("LP-1") og derefter "interleukin-7" ("IL-7"). Til kloning af et murint IL-7 cDNA, som anvendtes til opnåelse af det humane cDNA, anvendtes en ny kloningsteknik. Til opnåelse af en cellelinie, der udtrykte en opløselig murin IL-7 i påviselige mængder, etableredes en ny cellelinie ved transformering af stromaceller hidrørende fra en Whitlock-Witte kultur. Denne cellelinie, der udskiller en præ-B-cellevækstaktivitet i serum-frit medium, tilvejebragte specifik IL-7 budbringer-RNA til ekspressionskloning og protein til oprensning og sekvensering. Isolering af en murin cDNA-klon muliggjorde identifikation ved krydshybridisering af humane genom- og cDNA-kloner, der indkoder human IL-7.

Foreløbige forsøg, der omfattede administrering af oprenset rekombinant IL-7 til mus, har vist, at IL-7 udover at stimulere udviklingen og proliferationen af de hæmatopoietiske prækursorer for T- og B-celler også er i stand til at inducere proliferationen af megakaryocyt- og granulocyt/makrofag-prækursorer i knoglemarv. I betragtning af de potentielle immunologiske terapeutiske anvendelser til stimulering af proliferationen af prækursorer for T-celler og antistof-udskillende B-celler samt andre hæmatopoietiske celletyper er det af betydelig interesse at udvikle teknologier til fremstilling af biologisk aktive IL-7 molekyler. Anvendelse af rekombinante ekspressionssystemer kan tilvejebringe tilstrækkelige mængder af rent protein til at muliggøre en detaljeret undersøgelse af den biologiske aktivitet af sådanne molekyler og imødekomme den forventede kliniske efterspørgsel efter terapeutiske IL-7 præparater.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer mammale interleukin-7 (IL-7) proteiner, der tidligere blev betegnet lymfopoietin-1 ("LP-1"). Disse molekyler kan fremstilles ved oprensning fra cellekultursuperna-

tanter eller ved ekspression af DNA-sekvenser, der indkoder mammal IL-7. Sådanne sekvenser består i det væsentlige fortrinsvis af en enkelt åben læseramme-nukleotidsekvens, som kan udtrykkes i en rekombinant transkriptionel enhed under kontrol af mammale, mikrobielle eller virale transkriptionelle eller translationelle kontrolelementer. Den foreliggende opfindelse tilvejebringer også rekombinante ekspressionsvektorer omfattende DNA-sekvenserne, eukaryotiske og prokaryotiske ekspressionssystemer omfattende de rekombinante ekspressionsvektorer, fremgangsmåder til fremstilling af proteinerne ved oprensning fra mammale cellekulturmedier eller ved rekombinant ekspression i passende eukaryotiske eller prokaryotiske systemer, forskellige terapeutiske præparater og fremgangsmåder, der omfatter eller involverer anvendelsen af proteinerne ifølge opfindelsen, samt antistoffer, som er immunreaktive med proteinerne ifølge opfindelsen.

Herefter følger en kort beskrivelse af tegningen.

Fig. 1 viser restriktionskort over cDNA-kloner, der indkoder humane og murine IL-7 proteiner. Kasserne viser beliggenheden af de åbne læserammer og krydsskravering viser et signalpeptid eller en ledersekvens. De tilnærmede beliggenheder af udvalgte restriktionsendonukleasegenkendelsessteder er markeret.

Fig. 2 viser nukleotidsekvensen af en cDNA-klon, der indkoder murin IL-7 (mIL-7), som blev identificeret ved direkte ekspressionskloning under anvendelse af en mammal ekspressionsvektor. Startkodonen for det native protein i fuld længde, kodonen, der specificerer den N-terminale aminosyre af den modne sekvens samt termineringskodonen er understreget.

Fig. 3 viser nukleotidsekvensen og den deraf afledte aminosyresekvens af kodningsområdet af den murine cDNA-klon i fig. 2. Den modne proteinsekvens indkodes af den nukleotidsekvens, der begynder ved nukleotid 1 og ender ved nukleotid 387. Det formodede signalpeptid, der er indkodet som en ledersekvens for det native translationsprodukt, indkodes af nukleotiderne -75 til -1. Den N-terminale glutaminsyrerest af moden mIL-7 er understreget.

Fig. 4 viser nukleotidsekvensen af en cDNA-klon, der indkoder human IL-7 (hIL-7), som ved krydshybridiseringsundersøgelser blev isoleret ved anvendelse af en fra mIL-7 cDNA stammende probe. Startkodonen for det native protein i fuld længde, kodonen, der specificerer den N-terminale aminosyre af den modne sekvens, samt termineringskodonen er understreget.

Fig. 5 viser nukleotidsekvensen og den deraf afledte aminosyresekvens af kodningsområdet af hIL-7 cDNA-klonen i fig. 4. Det modne humane protein indkodes af den sekvens, der begynder ved nukleotid 1 og ender ved nukleotid 456. Et formodet hydrofobt signalpeptid, der er indkodes som en ledersekvens af det native translationsprodukt, indkodes af nukleotiderne −75 til −1. Den N-terminale asparaginsyrerest af det modne protein er understreget. Et plasmid, der bærer kodningssekvensen for hIL-7 i E. coli stamme JM107, blev deponeret i American Type Culture Collection d. 21. oktober 1987 under løbenummeret ATCC 67546.

Fig. 6 viser responsen af præ-B-celler (diagram A) og thymocytter (diagram B) over for IL-7. I det i diagram A afbildede forsøg dyrkedes præ-B-celler fra Whitlock-Witte knoglemarvskulturer (se nedenfor) ved en tæthed på 2,5 x 10^5 celler pr. ml i nærvær af IL-7 i tre dage ved 37°C. Der anvendtes to kilder for IL-7: seriefortyndinger af supernatanter fra COS-7 celler transficeret med en ekspressionsvektor indeholdende IL-7 genet (ikke udfyldte kvadrater) og oprenset rekombinant IL-7 protein, der begyndte ved en koncentration på 100 ng/ml (udfyldte kvadrater). I det i diagram B afbildede forsøg dyrkedes thymocytter ved en tæthed på 1 x 10^7 celler pr. ml under samme betingelser, med undtagelse af, at fortyndinger af oprenset rekombinant IL-7 protein påbegyndtes ved en koncentration på 1 µg/ml. I alle forsøg repræsenterer hver afbildet værdi middelværdien af tre prøver.

Fig. 7 er en skematisk afbildning af det mammale højekspressionsplasmid pDC201, som beskrives mere detaljeret i eksempel 7.

1. Definitioner

"Interleukin-7" og "IL-7" betegner et mammalt endogent sekretorisk protein, som er i stand til at inducere proliferation af lymfocyt-stamformer og -prækursorer stammende fra knoglemarv, indbefattende de specialiserede prækursorer, der er kendt som præ-B-celler. Alternative betegnelser for dette molekyle er "præ-B-cellevækstfaktor" og "lymfopoietin-1". Den forudsagte molekylvægt af det modne murine protein, der svarer til den i fig. 3 afbildede sekvens, er 14.897 dalton, eksklusive en eventuel glycosylering. Den anslåede molekylvægt af det modne humane protein, der svarer til den i fig. 5 afbildede sekvens, er 17.387 dalton, eksklusive glycosylering. Som anvendt i hele beskrivelsen betyder udtrykket "moden" et protein, som er udtrykt i en form, der mangler en

ledersekvens, som kan være til stede ved transkriptioner af et nativt gen i fuld længde.

"I det væsentlige homologe" eller "i det væsentlige identiske", som kan anvendes både i forbindelse med nukleinsyre- og aminosyresekvenser, betyder, at en given sekvens, fx. en mutantsekvens, afviger fra en referencesekvens ved en eller flere substitutioner, udeladelser eller tilføjelser, idet dette dog i sidste instans ikke resulterer i en ugunstig funktionel ulighed mellem referencesekvenserne og de pågældende sekvenser. Med hensyn til den foreliggende opfindelse anses aminosyresekvenser med mere end 90% lighed, ækvivalent biologisk aktivitet og ækvivalente ekspressionskarakteristika for i det væsentlige identiske eller homologe, og tilhører den gruppe proteiner, der defineres ved udtrykket "interleukin-7". Aminosyresekvenser med mere end 40% lighed anses for i det væsentlige lig hinanden. Ved definering af nukleinsyresekvenser anses alle omhandlede nukleinsyresekvenser, som er i stand til at indkode i det væsentlige homologe eller lignende aminosyresekvenser, for i det væsentlige homologe med eller lignende en referencenukleinsyresekvens. Til bestemmelse af homologi eller lighed bør afskæring eller interne udeladelser af referencesekvensen lades ude af betragtning. Sekvenser med mindre grader af homologi og sammenlignelig bioaktivitet anses for at være ækvivalente. Med hensyn til den foreliggende opfindelse anses en "underenhed" af et IL-7 protein for at udgøre en aminosyresekvens på mindst 20 aminosyrer.

Som anvendt i det foreliggende betyder "rekombinant", at et protein stammer fra rekombinante (fx. mikrobielle eller mammale) ekspressionssystemer, hvilket kan indbefatte transformation af celler af en hvilken som helst art ved af fagmanden kendte teknikker. "Mikrobiel" betegner rekombinante proteiner fremstillet i bakterie- eller fungus (fx. gær) ekspressionssystemer. Som et produkt definerer "rekombinant mikrobielt" et protein, der i det væsentlige er fri for native endogene substanser og ikke er ledsaget af dermed forbundet nativ glycosylering. Protein udtrykt i de fleste bakteriekulturer, fx. E. coli, vil være fri for glycan. Protein udtrykt i gær, vil udvise et glycosyleringsmønster, der adskiller sig fra det mønster, som udtrykkes i mammale celler.

"Isoleret DNA-sekvens" betegner en DNA-polymer i form af et separat fragment eller som en komponent af en større DNA-konstruktion, som stammer fra DNA, der mindst en gang er blevet isoleret i det væsentlige i ren form, dvs. fri for kontaminerende endogent materiale og i en mæng-

de eller koncentration, der muliggør identifikation, manipulation og udvinding af sekvensen og dens nukleotidsekvenskomponenter ved biokemiske standardmetoder, fx. under anvendelse af en kloningsvektor. Sådanne isolerede sekvenser tilvejebringes fortrinsvis i form af en åben læseramme, der ikke er afbrdt af interne ikke-translaterede sekvenser eller introner, der typisk er til stede i eukaryotiske gener. Sekvenser af ikke-translateret DNA kan være til stede nedenstrøms for den åbne læseramme, hvor de ikke forstyrrer manipulation eller ekspression af kodningsområderne. "Nukleotidsekvens" betegner en heteropolymer af deoxyribonukleotider. I almindelighed sammles DNA-sekvenser, der indkoder proteinerne ifølge opfindelsen, af cDNA-fragmenter og korte oligonukleotidlinkere eller af en række oligonukleotider til opnåelse af et syntetisk gen, som kan udtrykkes i en rekombinant transkriptionel enhed. IL-7 DNA'er kan også isoleres fra genom-DNA fra en hvilken som helst mammal celle.

"Rekombinant ekspressionsvektor" betegner et plasmid omfattende en transkriptionel enhed, der omfatter en samling af (1) et eller flere genetiske elementer med en regulatorisk rolle ved genekspression, fx. promotorer eller forstærkere, (2) en strukturel- eller kodningssekvens, der transkriberes til mRNA og translateres til protein, og (3) passende transkriptionsstart- og -termineringssekvenser. Strukturelle elementer beregnet til anvendelse i gærekspressionssystemer indbefatter fortrinsvis en ledersekvens, der muliggør ekstracellulær udskillelse af translateret protein af en værtscelle. Alternativt kan rekombinant protein, hvor det bliver udtrykt uden en leder- eller transportsekvens, indbefatte en N-terminal methioninrest. Denne rest kan eventuelt derefter spaltes fra det udtrykte rekombinante protein til opnåelse af et slutprodukt. Vektorer, der er potentielt anvendelige til ekspression af biologisk aktive IL-7 proteiner, omfatter også viruser, fx. fag, eller DNA-fragmenter, som ved rekombination kan integreres i værtsgenomet.

"Rekombinant mikrobielt ekspressionssystem" betyder en i det væsentlige homogen monokultur af egnede værtsmikroorganismer, fx. bakterier såsom E. coli eller gær såsom S. cerevisiae, som har en rekombinant transkriptionel enhed stabilt integreret i kromosomal DNA eller bærer den rekombinante transkriptionelle enhed som en komponent af et forekommende plasmid. I almindelighed stammer celler, der udgør systemet, fra en enkelt stamtransformant. Som defineret i det foreliggende vil rekombinante ekspressionssystemer udtrykke heterologt protein ved induktion af de regulatoriske elementer, som er kædet til DNA-sekvensen eller til

det syntetiske gen, som skal udtrykkes.

2. Udvikling af IL-7 assay og kilder for cellefaktor

Til identfikation af en faktor, der udskilles af murine knoglemarvsstromaceller, som regulerer præ-B-cellevækst, i cellekultur, anvendtes et in vitro kultursystem for B-celleprækursorer. Den iagttagne strenge afhængighed af præ-B-cellens vækst af deres stromafødelag i Whitlock-Witte kulturer lod formode, at stromacellerne frembragte en præ-B-cellevækst-stimulerende aktivitet. Til karakterisering af denne vækstaktivitet udvikledes en kvantitativ assay, og der ledtes efter en cellekilde for den præ-B-cellevækstfremmende aktivitet.

Ved indledningsvise forsøg på at udvikle en bioassay anvendtes cellefrie supernatanter fra langtids-stromaknoglemarvs(føde)lag som en kilde for vækstfremmende aktivitet. I almindelighed var assay-resultaterne usikre, fordi der iagttoges et stimulationsindeks på kun to til fire gange over baggrund. Dette stemmer overens med de af Whitlock et al., Cell 48:1009 (1987), og Hunt et al., Cell 48:997 (1987), rapporterede resultater. Til undgåelse af denne hindring og etablering af en egnet cellekilde for vækstfaktor frembragtes en immortaliseret cellelinie ved transfektion af stromaceller fra langtids-knoglemarvskulturer med det pSV3neo-plasmid, der indeholder de SV40 T antigen-transformerende sekvenser. Det blev fundet, at en resulterende klonal cellelinie, betegnet IxN/A6, grundlæggende producerer en faktor, som er i stand til at støtte væksten af prækursor-B-celler. Det blev herefter fundet, at der kunne frembringes sammenlignelige niveauer af præ-B-cellevækstfremmende aktivitet, når cellerne dyrkedes under serum-frie betingelser i nærvær af 1 µg/ml LPS.

Til frembringelse af en optimal assay-sensibilitet opnåedes en stærkt beriget population af prækursor-B-celler fra langtids-knoglemarvskulturer. Der anvendtes et yderligere celleberigelsestrin, hvor der udførtes en en passage over G-10 Sephadex til opnåelse af en mere homogen population, som var i stand til at frembringe egnede biologiske assayresultater. Specificiteten af dette assaysystem testedes med andre definerede faktorer. Ingen af de testede faktorer, inklusive IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, GM-CSF, G-CSF, CSF-1, BSF-2, α-, β- og γ-interferon, neuroleukin og den transformerende vækstfaktor β, var i stand til at inducere stimulering af thymidininkorporering over baggrundsni-

veauer over en række faktorkoncentrationer. Desuden fremkaldte renset mIL-7 ingen respons i standardbioassays for IL-1, IL-2, IL-3, GM-CSF (FDCP$_2$-1D), IL-4, IL-5, G-CSF, CSF-1 og interferon. Imidlertid stimulerede cellefrie supernatanter fra IxN/A6-cellelinien dannelsen af murine kolonier af makrofagtype i blød agar. Fraktionering af IxN/A6-konditioneret medium ved DEAE-Sephacel kromatografi opløste den kolonistimulerende aktivitet fra den præ-B-cellevækstfremmende aktivitet. En foretrukket assayprotokol for IL-7 aktivitet er beskrevet nedenfor.

3. Assay for IL-7 biologisk aktivitet

Til etablering af en præ-B-celleprækursorpopulation startedes knoglemarvskulturer og holdtes som beskrevet af Whitlock et al., J. Immunol. Meth. 67:353 (1983), i RPMI 1640 suppleret med en udvalgt portion 5% kalvefosterserum (FBS) (Irvine Scientific, Santa Clara, CA, USA), 50 µM 2-mercaptoethanol, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin og 2 mM L-glutamin.

De fra denne type kultursystem opnåede ikke-adhærente hæmatopoietiske celler er blevet vist at omfatte B-stamformceller, præ-B-celler og nogle tidlige B-celler. Se Whitlock et al., Cell 32:903 (1983). Dorshkind et al., J. Immunol. 137:3457 (1986) påviste klart, at celler fra sådanne knoglemarvskulturer var i stand til at rekonstituere både B-celle- og T-celleafsnittene i kombinerede mus med immundefekt, hvilket viser, at et lymfoidt stamcelleelement også kan være til stede i disse kulturer. På nuværende tidspunkt er det komplette repertoire af ansvarlige celler ikke blevet bestemt, men det er klart, at denne population omfatter prækursorceller af B-afstamning. Disse celler ser ud som lymfocytter med en stor kerne og en lille rand af cytoplasma, der stemmer overens med en præ-B-cellefænotype.

Til analyse fjernes ikke-adhærente præ-B-celler fra adhærente stromalag af Whitlock-Witte-kulturer ved forsigtig pipettering, pelleteres ved centrifugering og resuspenderes i 1-2 ml Iscoves modificeret Dulbeccos-medium (IMDM) indeholdende 5% FBS, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin og 2 mM L-glutamin (assaymedium).

Cellerne anbringes dernæst i en lille søjle med Sephadex G-10 (varemærke tilhørende Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Uppsala, SE, for gelfiltreringsmedier) ved en tæthed på mindre end 10^6 celler pr. ml gel til fjernelse af eventuelle løsnede celler, kontaminerende adhærente

celler eller stromaceller, og inkuberes dernæst ved stuetemperatur i 10 minutter som beskrevet af Ly et al., J. Immunol. Meth. 5:239 (1974). Præ-B-cellerne elueres dernæst fra G10-kolonnen med assaymedium, vaskes og resuspenderes til en tæthed på 2,5 x 10^5 celler/ml i assaymedium. Prøver, som skal underkastes analyse, seriefortyndes i individuelle brønde i en mikrotiterplade med 96 brønde til et slutvolumen på 50 ml. 50 µl cellesuspension (12.500 celler/brønd) sættes til hver brønd, og pladerne inkuberes i 48 timer i en fugtet CO_2-inkubator indeholdende 7,5% CO_2, 5% O_2, rest N_2. Kulturerne pulseres i løbet af de sidste fire timers inkubation med 2 µCi/brønd tritieret thymidin (^{3}H-Td, NEN, 60-80 Ci/mmol) i et volumen på 25 µl. Kulturer høstes med en automatiseret høster på glasfiberfiltre og inkorporeret radioaktivitet bestemmes ved væskescintillationstælling. 1 enhed IL-7 defineres som den mængde faktor, der kræves til inducering af halv-maksimal ^{3}H-Tdr-inkorporering under de ovenfor for IL-7 assayen beskrevne betingelser.

Resultaterne af typiske præ-B-celleproliferationsassays under anvendelse af urensede og rensede fragmenter af rekombinante IL-7 er afbildet i fig. 6, diagram A.

4. Isolering af renset nativt protein

Udvikling af oprensningsmetoder for murin IL-7 afslørede, at faktorens biologiske aktivitet er stabil under mange forskellige betingelser inklusive ekstreme pH-værdier (2,1 til 9,0) og opløsninger indeholdende de organiske opløsningsmidler acetonitril eller n-propanol. Opløsning af aktiviteten med SDS-PAGE (natriumdodecylsulfat-polyacrylamidgelelektroforese) viste, at IL-7 aktiviteten var forbundet med et protein med M_r=25.000 og var stabil i nærvær af SDS og temperaturer på 70°C. Reduktion af proteinet ved kontakt med 1% 2-mercaptoethanol ødelagde imidlertid fuldstændigt dets biologiske aktivitet, hvilket indikerede tilstedeværelsen af intramolekylære disulfidbindinger. Præparativ SDS-PAGE gav et enkelt protein med M_r=25.000, der stemte overens med den biologiske aktivitet. Desuden blev radiomærket IL-7 bundet specifikt til celler, der reagerer på denne faktor, hvilket lader formode, at IL-7 ligesom andre polypeptidhormoner binder til specifikke receptorer på celleoverflader. Oprensningsprotokollen resulterede i en 10 million fold oprensning med et slutudbytte på 35%. En ved Edman-nedbrydning opnået N-terminal sekvens var X-X-His-Ile-Lys-Asp-Lys-Glu-X-Lys-Ala-Tyr-Glu-X-

Val-Met, som var enestående, når den sammenlignedes med en database af offentligt tilgængelige proteinsekvenser.

Den oprensede IL-7 udviste en anslået specifik aktivitet på ca. 4 x 10^6 enheder/µg protein og var aktiv ved en koncentration på 10^{-1} pM, baseret på visuelle bedømmelser af proteinkoncentrationen bestemt ved intensiteten af sølv-farvet SDS-PAGE. Denne indledningsvise bedømmelse af den specifikke aktivitet ved præ-B-celleproliferationsanalysen er blevet revideret nedad i lyset af mere nøjagtige bestemmelser af proteinkoncentrationer. Den specifikke aktivitet af renset rekombinant IL-7 i præ-B-celleproliferationsanalysen synes at ligge i området fra 1-2 x 10^5 enheder/µg.

5. Isolering af cDNA'er

Til opnåelse af den murine kodningssekvens isoleredes en DNA-sekvens, der indkoder mIL-7, fra et cDNA-bibliotek fremstillet ved revers transkription af polyadenyleret RNA isoleret fra den transformerede murine stromacellelinie IxN/A6. Biblioteket screenedes ved direkte ekspression af cDNA-fragmentpuljer i abe COS-7 celler under anvendelse af en mammal ekspressionsvektor (pDC201), der anvender regulatoriske sekvenser stammende fra SV40 og Adenovirus 2. Ca. 720.000 cDNA'er screenedes i puljer på ca. 1000 cDNA'er indtil assay af supernatanten af en transficeret pulje påviste en tifold forøgelse i thymidininkorporering i forhold til baggrund. Et nedfrosset bakterieforråd fra denne positive pulje anvendtes så til opnåelse af plader med ca. 200 kolonier. Plasmid-DNA fra kolonierne på hver af disse plader sammenblandedes og transformeredes i COS-7 celler, og en positiv pulje identificeredes. Individuelle kolonier fra denne pulje screenedes, indtil der identificeredes en enkelt klon, der styrede syntesen af et 25 kilodalton protein med påviselig IL-7 aktivitet. Denne klon isoleredes og dens indskud sekvensbestemtes til bestemmelse af kodningssekvensen af det i fig. 2 viste murine cDNA. Dette cDNA omfatter et langt ikke-translateret område på 548 basepar ved siden af translationsbegyndelsesstedet. Begyndelsesstedet for det modne protein udledtes ved sammenligning med en N-terminal aminosyresekvens opnået fra højt oprensede præparater af IL-7 stammende fra A6 cellesupernatanter. Kodningsområdet indeholder 6 cysteinrester og to potentielle N-glycosyleringssteder.

Prober konstrueredes fra den murine sekvens og anvendtes til

screening af humane genom-DNA-biblioteker og humane cDNA-biblioteker stammende fra kulturer af den humane leveradenocarcinomacellelinie SK-HEP-1 (ATCC HTB-52). cDNA-kloner, der hybridiserede til oligonukleotid-prober stammende fra humane genomsekvenser, og prober omfattende udvalgte 3' og 5' utranslaterede sekvenser af det murine gen isoleredes og sekvensbestemtes derefter. Den således isolerede fulde cDNA-sekvens er afbildet i fig. 4, og den deraf afledte kodningssekvens er afbildet i fig. 5.

Human IL-7 indkodes af et multi-exon gen. Ved isolering af den i fig. 4 viste cDNA-klon iagttoges flere alternative mRNA-konstruktioner, som kan tilskrives forskellige mRNA-splejsningsforekomster efter transkription. Disse alternative konstruktioner, som har store homologiområder til fælles med de cDNA'er, der specifikt er anført i kravene, anses for at ligge inden for opfindelsens rammer.

6. Syntetiske DNA-konstruktioner

I sine nukleinsyreudførelsesformer tilvejebringer den foreliggende opfindelse DNA-sekvenser, der indkoder mammale IL-7'er, IL-7 analoge og underenheder. Eksempler på mammale IL-7'er omfatter IL-7'er fra primater, mennesker, mus, hunde, katte, heste, kvæg, svin, får, hjorte og geder. IL-7 DNA tilvejebringes fortrinsvis i en form, som kan udtrykkes i en rekombinant transkriptionel enhed under kontrol af mammale, mikrobielle eller virale transkriptionelle eller translationelle kontrolelementer. En sekvens, som skal udtrykkes i en mikroorganisme, vil fx. ikke indeholde introner. I foretrukne aspekter omfatter DNA-sekvenserne mindst en, men eventuelt mere end en sekvenskomponent stammende fra en cDNA-sekvens eller kopi deraf. Sådanne sekvenser kan være bundet til eller flankeret af DNA-sekvenser fremstillet ved samling af syntetiske oligonukleotider. Eksempler på sekvenser omfatter sådanne, som i det væsentlige er homologe med de i fig. 3 og fig. 5 afbildede nukleotidsekvenser. Kodningssekvenserne kan eventuelt omfatte kodoner, der indkoder en eller flere yderligere aminosyrer, som befinder sig ved N-terminal, fx. en N-terminal ATG-kodon, der specificerer methionin, som i en læseramme er forbundet med nukleotidsekvensen. P.g.a. kodedegeneration kan der forekomme betydelige variationer i nukleotidsekvenser, der koder for samme aminosyresekvens. Et eksempel på en DNA-udførelsesform er den, der svarer til sekvensen af nukleotiderne 1-387 i fig. 3. Syntetiske DNA-se-

kvenser, der indkoder IL-7 proteiner, som omfatter nukleotidsekvenser, der er ændret til indføring af restriktionssteder eller en foretrukket kodonanvendelse for bakterieekspression falder inden for opfindelsens rammer.

Den foreliggende opfindelse tilvejebringer også ekspressionsvektorer til fremstilling af nyttige mængder oprenset IL-7, som kan omfatte syntetiske eller af cDNA afledte DNA-fragmenter, der indkoder mammale IL-7'er eller IL-7 analoge eller underenheder, som operativt er bundet til regulatoriske elementer stammende fra mammale, bakterielle, gær- bakteriofag- eller virale gener. Nyttige regulatoriske elementer er beskrevet mere detaljeret nedenfor. Efter transformation eller transfektion af passende cellelinier kan sådanne vektorer påvirkes til at udtrykke rekombinant protein.

7. Rekombinante ekspressionssystemer

Mammale IL-7'er kan udtrykkes i mammale celler eller insektceller, gær, bakterier eller andre celler under kontrol af passende promotorer. Cellefrie translationssystemer kan også anvendes til fremstilling af mammal IL-7 under anvendelse af RNA'er afledt af DNA-konstruktioner ifølge opfindelsen. Passende klonings- og ekspressionsvektorer til anvendelse med bakterielle, svampe-, gær- og mammale celleværter er beskrevet af Pouwels et al., Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, New York, 1985), hvis relevante dele hermed inkorporeres ved henvisning.

Forskellige mammale cellekultursystemer kan anvendes til at udtrykke rekombinant protein. Eksempler på mammale ekspressionssystemer omfatter COS-7 linierne af abenyrefibroblaster beskrevet af Gluzman, Cell 23:175 (1981), og andre cellelinier, som er i stand til at udtrykke en kompatibel vektor, fx. cellelinierne C127, 3T3, CHO, HeLa og BHK. Mammale ekspressionsvektorer kan omfatte ikke-transkriberede elementer såsom et replikationsområde, en egnet promotor og forstærker, og andre 5'- og 3'-flankerende ikke-transkriberede sekvenser og 5' eller 3' ikke-translaterede sekvenser såsom nødvendige ribosombindingssteder, et polyadenyleringssted, splejsningsdonor- og acceptorsteder, samt termineringssekvenser. DNA-sekvenser stammende fra det SV40 virale genom, fx. SV40-område-, tidlige promotor-, forstærker-, splejsnings- og polyadenyleringssteder kan anvendes til tilvejebringelse af de andre, til eks-

pression af en heterolog DNA-sekvens nødvendige, genetiske elementer. Yderligere detaljer med hensyn til anvendelsen af mammale højekspressionsvektorer til fremstilling af en rekombinant mammal IL-7 er vist i eksemplerne 3 og 8 nedenfor. Eksempelvis kan vektorer opbygges som beskrevet af Okayama og Berg, Mol. Cell. Biol. 3:280 (1983), Cosman et al., Nature 312:768 (1984), Cosman et al., Mol. Immunol. 23:935 (1986), eller Clark et al., US-patentskrift nr. 4.675.285.

Gærsystemer, i hvilke der fortrinsvis anvendes Saccharomyces-arter såsom S. cerevisiae, kan også anvendes til ekspression af de rekombinante proteiner ifølge opfindelsen, såvel som gær af andre slægter, fx. Pichia eller Kluyveromyces.

Generelt vil nyttige gærvektorer omfatte replikationsområder og valgbare markører, der tillader transformation af både gær og E. coli, fx. ampicillinresistensgenet af E. coli og S. cerevisiae TRP1 gen, og en promotor stammende fra et højt udtrykt gærgen til fremkaldelse af transkription af en nedenstrøms strukturel sekvens. Sådanne promotorer kan stamme fra transkriptionelle gærenheder, der indkoder højt udtrykte gener såsom bl.a. 3-phosphoglyceratkinase (PGK), α-faktor, sur phosphatase eller varmechockproteiner. Den heterologe strukturelle sekvens sammenstilles i en passende ramme med translationsinitierings- og termineringssekvenser og fortrinsvis en ledersekvens, som er i stand til at styre udskillelse af translateret protein i det ekstracellulære medium. Den heterologe sekvens kan eventuelt indkode et fusionsprotein, der indbefatter et N-terminalidentifikationspeptid (fx. Asp-Tyr-Lys-$(Asp)_4$-Lys) eller en anden sekvens, der giver de ønskede karakteristika, fx. stabilisering eller forenklet oprensning af udtrykt rekombinant produkt.

Nyttige gærvektorer kan samles under anvendelse af DNA-sekvenser fra pBR322 for udvælgelse og replikation i E. coli (Amp^r-gen og replikationsområde) og gær-DNA-sekvenser, der omfatter en alkoholdehydrogenase 2 (ADH2) promotor, som kan undertrykkes med glucose. ADH2-promotoren er blevet beskrevet af Russell et al., J. Biol. Chem. 258:2674 (1982) og Beier et al., Nature 300:724 (1982). Sådanne vektorer kan også omfatte et gær TRP1-gen som en valgbar markør og gær 2 μ replikationsområdet. En gærledersekvens, fx. α-faktorlederen, der styrer udskillelse af heterologe proteiner fra en gærvært, kan indføjes mellem promotoren og det strukturelle gen, som skal udtrykkes. Se. Kurjan et al., US-patentskrift nr. 4.546.082, Kurjan et al., Cell 30:933 (1982), og Bitter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:5330 (1984). Ledersekvensen kan modifice-

res til nær dens 3'-ende at indeholde et eller flere nyttige restriktionssteder for at lette fusion af ledersekvensen til fremmede gener.

Egnede gærtransformationsprotokoller er kendt af fagmanden. En teknik er eksempelvis beskrevet af Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929 (1978), der udvælger for Trp^+-transformanter i et selektivt medium bestående af 0,67% gærnitrogenbase, 0,5% casaminosyrer, 2% glucose, 10 µg/ml adenin og 20 µg/ml uracil.

Værtsstammer transformeret med vektorer, der omfatter ADH2-promotoren, kan dyrkes for ekspression i et rigt medium bestående af 1% gærekstrakt, 2% pepton og 1% glucose suppleret med 80 µg/ml adenin og 80 µg/ml uracil. Ophævelse af undertrykkelsen af ADH2-promotoren optræder, når glucosen i mediet er blevet opbrugt. Urensede gærsupernatanter høstes ved filtrering og holdes ved 4°C før yderligere oprensning. Anvendelse af et gærekspressionssystem til fremstilling af en rekombinant mammal IL-7 beskrives i eksempel 4 nedenfor.

Anvendelige ekspressionvektorer til bakteriel anvendelse opbygges ved indføjelse af en strukturel DNA-sekvens, der indkoder mammal IL-7, sammen med egnede translationsinitierings- og termineringssignaler i den operative læsefase med en funktionel promotor. Vektoren omfatter en eller flere fænotypisk valgbare markører og et replikationsområde til sikring af forstærkning i værten. Egnede prokaryotiske værter for transformation omfatter E. coli, Bacillus subtilis, Salmonella typhimurium og forskellige arter af Pseudomonas, Streptomyces og Staphylococcus slægterne, selvom det også kan vælges at anvende andre arter.

Ekspressionsvektorer opbygges passende ved spaltning af cDNA-kloner ved steder i nærheden af kodonen, der indkoder den N-terminale rest af det modne protein. For eksempel kan det murine cDNA skæres med NdeI eller ClaI, eller det humane cDNA med ClaI, til frembringelse af et fragment, der i det væsentlige omfatter hele kodningsområdet. Syntetiske oligonukleotider kan så anvendes til at "tilbageføre" eventuelle udeladte afsnit af kodningsområdet og tilvejebringe en forbindelsessekvens til ligering af kodningsfragmentet i en passende læseramme i ekspressionsvektoren, og eventuelt en kodon, der specificerer et initiatormethionin.

Som et repræsentativt, men ikke begrænsende eksempel, kan nyttige ekspressionsvektorer til bakteriel anvendelse omfatte en valgbar markør og et bakterielt replikationsområde stammende fra kommercielt tilgængelige plasmider, der omfatter genetiske elementer af den velkendte klo-

ningsvektor pBR322 (ATCC 37017). Sådanne kommercielle vektorer omfatter fx. pKK223-3 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sverige) og pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA). Disse pBR322 "skelet"-afsnit kombineres med en passende promotor og den strukturelle sekvens, som skal udtrykkes. Et specielt nyttigt bakterielt ekspressionssystem anvender fag λ P_L promotoren og den cI857ts termolabile repressor. Plasmidvektorer, der kan opnås fra American Type Culture Collection og inkorporerer derivater af λ P_L promotoren, omfatter plasmid pHUB2, som forefindes i E. coli stamme JMB9 (ATCC 37092), og pPLc28, som forefindes i E. coli RR1 (ATCC 53082). Andre nyttige promotorer til ekspression i E. coli omfatter den af Studier et al., J. Mol. Biol. 189:113 (1986), beskrevne T7 RNA-polymerasepromotor, den af Lauer, J. Mol. Appl. Genet. 1:139-147 (1981) beskrevne lacZ-promotor, som er tilgængelig som ATCC 37121, og den af Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory, 1982, p. 412), beskrevne tac-promotor, som er tilgængelig som ATCC 37138.

Efter transformation af en passende værtsstamme og dyrkning af værtsstammen til en passende celletæthed ophæves undertrykkelsen af den udvalgte promotor med passende foranstaltninger (fx. temperaturændring eller kemisk påvirkning), og cellerne dyrkes i yderligere et stykke tid. Cellerne høstes typisk ved centrifugering, brydes med fysiske eller kemiske midler, og den resulterende rå ekstrakt gemmes til yderligere oprensning. Cellerne dyrkes fx. i en 10 l fermenteringsbeholder under maksimal beluftning og kraftig omrøring. Fortrinsvis anvendes et antiskummiddel (Antifoam A). Kulturer dyrkes ved 30°C i det af Mott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:88 (1985), beskrevne superinduktionsmedium, der eventuelt omfatter antibiotika, undertrykkelsen ophæves ved en celletæthed svarende til A_{600} = 0,4-0,5 ved at hæve temperaturen til 42°C, og cellerne høstes fra 2 til 20, fortrinsvis 3 til 6 timer efter temperaturændringen i opadgående retning. Cellemassen koncentreres indledningsvis ved filtrering eller andre foranstaltninger og centrifugeres så ved 10.000 x g i 10 minutter ved 4°C efterfulgt af hurtig nedfrysning af cellepelleten.

Anvendelsen af et bakterielt ekspressionssystem til fremstilling af en rekombinant mammal IL-7 er beskrevet i eksempel 5 nedenfor.

8. Oprensningsfremgangsmåder

Fortrinsvis fremstilles oprensede mammale IL-7'er eller bioækvivalente homologe ved dyrkning af egnede vært/vektorsystemer til ekspression af de rekombinante translationsprodukter af de syntetiske gener ifølge opfindelsen, som derefter oprenses fra kulturmedier.

En alternativ fremgangsmåde til fremstilling af renset IL-7 omfatter oprensning fra cellekultursupernatanter. Ved denne fremgangsmåde anvendes en cellelinie, som opbygger nyttige mængder af proteinet. Supernatanter fra sådanne cellelinier kan eventuelt koncentreres under anvendelse af et kommercielt tilgængeligt proteinkoncentrationsfilter, fx. en Amicon (varemærke tilhørende W.R. Grace & Co., Danvers, MA, USA) eller Pellicon (varemærke tilhørende Millipore Corp., Bedford, MA, USA) ultrafiltreringsenhed. Efter koncentrationstrinnet kan koncentratet tilføres en egnet anionbytterharpiks, fx. en matrix eller et substrat med diethylaminoethyl (DEAE) sidegrupper. Matrixerne kan være acrylamid, agarose, dextran, cellulose eller andre typer, der sædvanligvis anvendes til proteinoprensning. En foretrukket matrix er DEAE-Sephacel (Pharmacia). Når der anvendes medier, som indeholder DEAE-grupper, tilføres ekstrakter indeholdende IL-7, ved en svagt basisk pH-værdi (fx. pH 8) og ved en natriumchloridkoncentration (eller et andet egnet salt) på ca. 100 mM. Mange kontaminerende proteiner bindes af ionbytteren, mens IL-7 udvindes i ubundne fraktioner.

Efter anionbytningskromatografi kan anvendes et kationbytningstrin. I dette trin tilføres IL-7-holdige fraktioner til en kationbytter under svagt sure betingelser med en lav saltkoncentration (fx. pH 5, 100 mM NaCl). IL-7 bindes af ionbytteren og kan elueres i en mere oprenset form ved højere saltkoncentrationer og ved en svagt basisk pH-værdi. Egnede kationbyttere omfatter forskellige uopløselige matrixer omfattende sulfopropyl- eller carboxymethylgrupper. Sulfopropylgrupper er foretrukket. Et egnet materiale til IL-7 oprensning er SP-trisacryl (Pharmacia-LKB). Efter kationbytterkromatografi har et affinitetstrin, hvori der anvendes en matrix med en blå farveligand, vist sig at være til nytte. Egnede farveligander omfatter Blue B, der kan opnås som et konjugat med agarose (Blue B agarose). Andre farveligandækvivalenter kan også anvendes. Til sidst kan der til yderligere oprensning af et IL-7 præparat anvendes et eller flere revers fase højtryksvæskekromatografitrin (RP-HPLC) under anvendelse af hydrofobe RP-HPLC-medier, fx. silicagel med

methylsidegrupper eller andre alifatiske sidegrupper. Nogle eller alle de foregående oprensningstrin kan i forskellige kombinationer også anvendes til tilvejebringelse af et homogent rekombinant protein.

I bakteriekultur fremstillet rekombinant protein isoleres sædvanligvis ved indledningsvis ekstraktion fra cellepelleter efterfulgt af et eller flere koncentrationstrin, udsaltningstrin, vandige ionbytter- eller størrelsesudelukkelses-kromatografitrin. Proteinet kan renatureres efter bakterieekspression ved kontakt med et katalytisk reduktionsmiddel ved en proteinkoncentration på 10-50 µg/ml i nærvær af 1-6 M guanidin,HCl for at hindre aggregering. Til sidst kan højtryksvæskekromatografi (HPLC) anvendes til det endelige oprensningstrin. Mikrobielle celler anvendt til ekspression af rekombinant mammal IL-7 kan afbrydes ved en hvilken som helst passende metode, inklusive nedfrysnings-optønings-cykler, sonikering, mekanisk brydning eller anvendelse af cellelyseringsmidler.

Fermentering af gær, der udtrykker mammal IL-7 som et udskilt protein, forenkler oprensningen i høj grad. Udskilt rekombinant protein stammende fra fermentering i stor målestok kan oprenses ved fremgangsmåder, som er analoge med de af Urdal et al., J. Chromatog. 296:171 (1984) beskrevne fremgangsmåder. Denne reference beskriver to sekventielle revers fase HPLC-trin til oprensning af rekombinant human GM-CSF på en præparativ HPLC-kolonne.

Som anvendt heri henviser "renset eller oprenset" til et mammalt IL-7 præparat med en specifik aktivitet på mindst ca. 10^4 enheder pr. µg protein i en præ-B-celleproliferationsassay som beskrevet andetsteds i beskrivelsen. Fortrinsvis udviser oprensede IL-7 præparater en specifik aktivitet på mindst ca. 10^5 enheder/µg.

9. Biologisk aktive proteinanaloge

I sine forskellige proteinudførelsesformer tilvejebringer den foreliggende opfindelse i det væsentlige homogene rekombinante mammale IL-7 polypeptider, som er fri for kontaminerende endogene materialer og eventuelt uden dermed forbundet glycosylering af native mønstre. De native murine og humane IL-7 molekyler udvindes fra cellekulturen som glycoproteiner med en tilsyneladende molekylvægt på ca. 25 kilodalton (kD) ved SDS-PAGE. IL-7'er udtrykt i mammale ekspressionssystemer, fx. COS-7 celler, kan have lignende eller lidt afvigende molekylvægt og glycosyleringsmønster i forhold til de native molekyler, i afhængighed af eks-

pressionssystemet. Ekspression af IL-7 DNA'er i bakterier såsom E. coli giver ikke-glycosylerede molekyler med en tilsyneladende molekylvægt på ca. 16 kD ved SDS-PAGE under ikke-reducerende betingelser.

Rekombinant IL-7 proteiner ifølge opfindelsen omfatter også N-terminale murine og humane methionyl IL-7'er. Yderligere udførelsesformer, som kan komme i betragtning, er mammale IL-7'er udtrykt som fusionsproteiner med en polypeptidleder omfattende sekvensen Asp-Tyr-Lys-(Asp_4)-Lys eller andre egnede peptid- eller proteinsekvenser anvendt som hjælp til ekspression i mikroorganismer eller oprensning af mikrobielt udtrykte proteiner.

Bioækvivalente og biologisk aktive homologer eller analoger af proteinerne ifølge opfindelsen omfatter forskellige muteiner, fx. afkortede versioner af IL-7'er, hvori terminale eller indre rester eller sekvenser, som ikke behøves for den biologiske aktivitet, udelades, og også alloproteiner såsom dem, der er beskrevet af Koide et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:6237 (1988). Som anvendt heri betyder udtrykkene "bioækvivalent" og "biologisk aktiv", at et givet protein har en biologisk aktivitet til fælles med et nativt IL-7 molekyle. Andre muteiner, som kan komme på tale, er sådanne, hvori en eller flere cysteinrester er blevet udeladt er erstattet med andre aminosyrer, fx. neutrale aminosyrer, for at tilvejebringe gunstigere renaturerings- eller stabilitetsegenskaber. Andre forsøg på mutagenese omfatter modifikation af nabostillede dibasiske aminosyrerester til forøgelse af ekspression i gærsystemer, hvori der findes KEX2-proteaseaktivitet, eller modifikation af proteinsekvensen til eliminering af et eller flere N-bundne glycosyleringssteder. Det blev også iagttaget, at udeladelse af resterne 121-139 af det humane IL-7 molekyle, der ikke har nogle modparter i det murine IL-7 molekyle, ikke fjerner biologisk aktivitet i murine eller humane præ-B-celleassaysystemer.

Som anvendt heri betegner "mutant aminosyresekvens" et polypeptid indkodet af en nukleotidsekvens, der med vilje er gjort forskellig fra en nativ sekvens. "Mutant protein" eller "mutein" betyder et protein, der omfatter en mutant aminosyresekvens. "Nativ sekvens" betegner en aminosyre- eller nukleinsyresekvens, som er identisk med vildtypen eller den native form af et gen eller protein. Udtrykkene "KEX2-protease-genkendelsessted" og "N-glycosyleringssted" er defineret nedenfor. Udtrykket "inaktivere" som anvendt til definering af specielle aspekter af den foreliggende opfindelse betyder ændringen af et udvalgt KEX2-protea-

segenkendelsessted for at forsinke eller forhindre spaltning med KEX2-proteasen af Saccharomyces cerevisiae, eller ændre et N-glycosyleringssted til udelukkelse af covalent binding af oligosaccharidedele til specielle aminosyrerester.

Sted-specifikke mutageneseprocedurer kan anvendes til inaktivering af KEX2-proteasebehandlingssteder ved udeladelse, tilføjelse eller substituering af rester til ændring af Arg-Arg, Arg-Lys og Lys-Arg par til eliminering af forekomsten af disse nabostillede basiske rester. Lys-Lys par er betydeligt mindre tilbøjelige til KEX2-spaltning, og omdannelse af Arg-Lys eller Lys-Arg til Lys-Lys repræsenterer en konventionel og foretrukket fremgangsmåde til inaktivering af KEX2-steder. De resulterende muteiner er mindre tilbøjelige til spaltning med KEX2-proteasen på andre steder end gær α-faktorledersekvensen, hvor spaltning efter udskillelse er tilsigtet.

Mange udskilte proteiner opnår covalent bundne kulhydratenheder efter translation, hyppigt i form af oligosaccharidenheder bundet til asparaginsidekæder med N-glycosidbindinger. Både strukturen og antallet af oligosaccharidenheder bundet til et specielt udskilt protein kan være højst forskellig, hvilket resulterer i et bredt område af tilsyneladende molekylmasser, som kan tilskrives et enkelt glycoprotein. mIL-7 og hIL-7 er udskilte glycoproteiner af denne type. Forsøg på at udtrykke glycoproteiner i rekombinante systemer kan blive gjort mere kompliceret af den heterogenitet, der kan tilskrives denne variable kulhydratkomponent. Oprensede blandinger af rekombinante glycoproteiner såsom human eller murin granulocyt-makrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF) kan fx. bestå af fra 0 til 50 vægt-% kulhydrat. Miyajima et al., EMBO Journal 5:1193 (1986) rapporterede ekspression af en rekombinant murin GM-CSF, hvori N-glycosyleringssteder var blevet muteret for at forebygge glycosylering og reducere heterogenitet af det af gær udtrykte produkt.

Tilstedeværelsen af variable mængder af associerede kulhydrater i rekombinante udskilte glycoproteiner gør oprensningsprocedurerne mere kompliceret, hvilket resulterer i et reduceret udbytte. Hvis glycoproteinet desuden skal anvendes som et terapeutisk middel er der en mulighed for, at patienterne vil udvikle allergiske reaktioner mod gærkulhydratdelene, hvilket vil kræve en afbrydelse af terapien. På grund af dette kan biologisk aktive, homogene analoge af immunregulatoriske glycoproteiner med reduceret kulhydratmængde være ønskværdige til terapeutisk anvendelse.

Funktionelle mutantanaloge af mammale IL-7'er med inaktiverede N-glycosyleringssteder kan fremstilles ved oligonukleotidsyntese og ligering eller ved sted-specifikke mutageneseteknikker som beskrevet nedenfor. Disse analoge proteiner kan med godt udbytte fremstilles i en homogen, kulhydrat-reduceret form ved anvendelse af gærekspressionssystemer. N-glycosyleringssteder i eukaryotiske proteiner er karakteriseret ved aminosyretripletten Asn-A^1-Z, hvor A^1 er en hvilken som helst aminosyre med undtagelse af Pro, og Z er Ser eller Thr. I denne sekvens giver asparagin en aminosidekædegruppe til covalent binding af kulhydrat. Et sådant sted kan elimineres ved substituering af Asn eller rest Z med en anden aminosyre, udeladelse af Asn eller Z eller indføjelse af en anden aminosyre end Z mellem A^1 og Z, eller en andenaminosyre end Asn mellem Asn og A^1. Substitueringer udføres fortrinsvis på konventionel måde, dvs. de mest foretrukne subsitueringsaminosyrer er sådanne, som har lignende fysisk-kemiske egenskaber som den rest, der skal erstattes. På lignende måde bør der ved tilrettelæggelsen af en udeladelses- eller indføjelsesstrategi tages den potentielle virkning af udeladelsen eller indføjelsen på den biologiske aktivitet i betragtning.

Udover de ovenfor beskrevne specielle muteiner kan talrige DNA-konstruktioner indbefattende alle eller en del af de i fig. 1-5 afbildede nukleotidsekvenser sammen med oligonukleotidkassetter omfattende yderligere nyttige restriktionssteder fremstilles på bekvem måde. Mutationer kan indføres på specielle steder ved syntetisering af oligonukleotider indeholdende en mutantsekvens, flankeret af restriktionssteder, der muliggør ligering til fragmenter af den native sekvens. Efter ligering indkoder den resulterende rekonstruerede sekvens et mutein med den ønskede aminosyreindføjelse, -substitution eller -udeladelse.

Alternativt kan der anvendes oligonukleotid-styrede stedspecifikke mutageneseprocedurer til tilvejebringelse af et ændret gen med specielle kodoner, der er ændret iht. den påkrævede substituering, udeladelse eller indføjelse. Walder et al., Gene 42:133 (1986), Bauer et al., Gene 37:73 (1985), Craik, Biotechniques, januar 1985, 12-19, Smith et al., Genetic Engineering: Principles and Methods (Plenum Press, 1981), og US-patentskrift nr. 4.518.584 omhandler egnede teknikker og inkorporeres i det foreliggende ved henvisning.

I en udførelsesform af opfindelsen er aminosyresekvensen af IL-7 bundet til en gær α-faktor ledersekvens via en N-terminal fusionskonstruktion omfattende et nukleotid, der indkoder peptidet Asp-Tyr-Lys-

Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (DYKDDDDK). Sidstnævnte sekvens er i høj grad antigenisk og tilvejebringer en epitop, der bindes reversibelt af specifikt monoklonalt antistof, hvilket muliggør hurtig analyse og let oprensning af udtrykt rekombinant protein. Denne sekvens spaltes også specifikt af bovin mucosal enterokinase ved den rest, der følger umiddelbart efter Asp-Lys parret. Med dette peptid afsluttede fusionsproteiner kan også være resistente mod intracellulær nedbrydning i E. coli. En alternativ opbygning er Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys-Glu-Ile-Gly-Arg-Pro, der tilvejebringer et faktor X genkendelsessted umiddelbart nedenstrøms fra enterokinasestedet.

10. Administrering af IL-7

I sine præparat- og fremgangsmådeaspekter tilvejebringer den foreliggende opfindelse terapeutiske præparater omfattende en virksom mængde af et hvilket som helst af de mammale IL-7 proteiner ifølge opfindelsen og en egnet diluent eller bærer, samt fremgangsmåder til stimulering af B- og/eller T-lymfocytudvikling eller proliferation eller modulering eller forøgelse af immun, lymfopoietisk eller hæmatopoietisk respons i pattedyr, indbefattende mennesker, hvilke omfatter administrering af en virksom mængde af et hvilket som helst af de foregående præparater. Anvendelse i forbindelse eller blanding med andre lymfokiner, fx. IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, CSF-1, GM-CSF eller G-CSF, IFN-α, IFN-β eller IFN-γ, kommer også i betragtning.

Til terapeutisk anvendelse administreres en oprenset IL-7 til et pattedyr for en i det pågældende tilfælde passende behandling. Således kan fx. et mammalt IL-7 præparat administreret som en stimulator af præB- eller præ-T-celleproliferation eller som modulator af immun eller hæmatopoietisk effektorcelleudvikling, proliferaton eller funktion indgives ved bolusinjektion, fortløbende infusion, vedblivende frigørelse fra implantater eller andre egnede teknikker. Et IL-7 terapeutisk middel vil typisk blive administreret i form af et præparat omfattende oprenset protein i forbindelse med fysiologisk acceptable bærere, excipienser eller fortyndingsmidler. Neutralt pufret saltvand eller saltvand blandet med conspecifikt serumalbumin er eksempler på passende fortyndingsmidler. Produkt formuleres fortrinsvis som et lyofilisat under anvendelse af passende excipiensopløsninger (fx. saccharose) som diluenter. Passende doseringer kan bestemmes ved forsøg, i almindelighed kan doseringer

på 10 ng til 100 µg/kg/dag, fortrinsvis 100 ng til 1 µg/kg/dag i 1-20 dage forventes at fremkalde en biologisk virkning. Bolusinjektion på 1 µg/kg kan fx. gives med 4 dages intervaller som en stimulator af hæmatopoietisk celleudvikling.

De følgende eksempler belyser specielle aspekter af den foreliggende opfindelse, inklusive oprensning af nativ murin IL-7, kloning og ekspression af gener, der indkoder murine og humane IL-7 proteiner, oprensning af rekombinante murine og humane IL-7 proteiner til homogenitet, biologiske assays omfattende anvendelse af oprensede IL-7 proteiner og administrering af oprensede IL-7 proteiner til pattedyr i et terapeutisk modelsystem. I eksemplerne udførtes alle procedurer, der involverer anvendelse af DNA-enzymer, fx. restriktionsendonukleaser og DNA-polymeraser, iht. producentens anvisninger. Alle prober blev mærket med ^{32}P. Andre standardteknologier til nukleinsyremanipulation ligner i det væsentlige dem, der er beskrevet af Maniatis, ovenfor, og af Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology (Wiley-Interscience, Media, PA, USA).

Eksempel 1

Skabelse af en murin IL-7 producerende cellelinie (IxN/A6) ved transfektion, oprensning af murin IL-7 fra cellesupernatanter

Adhærente knoglemarvsstromaceller transficeredes med plasmidet pSV3neo indeholdende SV40 T antigentransformeringssekvenserne under anvendelse af en calciumphosphatprocedure som beskrevet af Southern et al., J. Mol. Appl. Genet. 1:327 (1982), og Graham et al., Virology 52:456 (1973), som modificeret af Wigler et al., Cell 14:725 (1978). De transficerede adhærente celler fjernedes med trypsin:EDTA og klonedes ved grænsefortynding. Supernatanterne fra de resulterende kloner testedes for IL-7 aktivitet og den bedste producent (IxN/A6) ekspanderedes for yderligere undersøgelse. Denne cellelinie overvågedes på månedsbasis for mycoplasma under anvendelse af kommercielt tilgængelige mycoplasmapåvisningssæt.

Konditionerede medier fra IxN/A6-celler fremstilledes i 1750 cm^2 vævskulturrulleflasker (Falcon #3029) på følgende måde. Når cellerne nåede sammenflydningsstadiet, erstattedes mediet med 1 l/rulleflaske serum-fri RPMI suppleret med 2,3 g/l glucose og 1,54 g/l natriumbicarbonat, der som stimulant indeholdt 1 µg/ml S. typhimurium LPS. Flaskerne gassedes med 10% CO_2 i luft og inkuberedes i 6 dage. Supernatanten hø-

stedes og koncentreredes dernæst 20-fold i et Amicon DC10 hulfiberapparat (10.000 MW afskæring). De rå koncentrater steriliseredes ved filtrering før analyse og oprensning.

1 l af det urensede, koncentrerede, konditionerede medium indstilledes til pH 8 med 1 N NaOH og fortyndedes med sterilt destilleret vand til en konduktivitet på 1 m Siemen/cm (en konduktivitet på 1 m Siemen/cm svarer til en natriumchloridkoncentration på 100 mM på en Radiometer CDM83 konduktivitetsmåler). Koncentratet overførtes så til en DEAE-Sephacel (Pharmacia) kolonne (5,0 x 15 cm), der forud var ækvilibreret med 20 mM Tris-HCl (pH 8) indeholdende 100 mM NaCl. Udløbet overvågedes ved OD_{280}, og den proteinholdige gennemløbsfraktion opsamledes for yderligere oprensning.

Den ikke-bindende fraktion fra DEAE-Sephacel-kolonnen indstilledes til pH 5 med 1 M citronsyre (fri syre). Denne overførtes så direkte til en kolonne (3,2 x 12,5 cm) af SP-Trisacryl (Pharmacia-LKB), der tidligere var blevet ækvilibreret i 10 mM citrat (pH 5,0) indeholdende 100 mM NaCl. Kolonnen vaskedes med 5 kolonnevolumener ækvilibreringspuffer efterfulgt af vask med 5 kolonnevolumener 20 mM Tris-HCl (pH 8). Når kolonneudløbets pH nåede 8 og OD_{280} var vendt tilbage til basislinieværdier, elueredes kolonnen med en 1 l lineær gradient fra 0,0 til 0,5 M natriumchlorid i 20 mM Tris-HCl (pH 8). Elueringen udførtes ved en strømningshastighed på 50 ml/time, og 10 ml fraktioner opsamledes og analyseredes for tilstedeværelsen af IL-7.

Kombinerede IL-7-holdige fraktioner fra to separate SP-Trisacryl-elueringer kombineredes og overførtes direkte til en kolonne (2,5 x 40 cm) af Blue B agarose (Amicon Corp., Danvers, MA, USA), der forud var blevet ækvilibreret i 20 mM Tris-HCl (pH 8) indeholdende 125 mM NaCl. Prøven tilsattes med en strømningshastighed på 15 ml/time. Efter vask med ækvilibreringspuffer indtil OD_{280} var vendt tilbage til basislinieværdier elueredes kolonnen med en 1 l lineær gradient fra 0,125 til 2 M NaCl i 20 mM Tris-HCl (pH 8). 10 ml fraktioner opsamledes ved en strømningshastighed på 25 ml/time og analyseredes for IL-7 aktivitet.

Højtryksvæskekromatografi (HPLC) udførtes med en Waters Associates (Milford, MA) væskekromatograf, der var forsynet med to model 510 pumper, en model 720 systemkontroller og en model 441 absorbansdetektor, der overvågede ved 214 nm i det væsentlige som beskrevet af Urdal et al., J. Chrom. 296:171 (1984). Store prøvevolumener pumpedes i kolonner med en minipumpe.

Fraktioner indeholdende IL-7 aktivitet fra Blue B agarosekromatografitrinnet sattes med en strømningshastighed på 5 ml/minut til en 8 mm x 10 cm radial PAK-patron (Waters Associates) indeholdende 15-20 µm Vydac C-4 revers fase siliciumoxid (Separations Group, Hesperia, CA, USA). Vand indeholdende 0,1% trifluoreddikesyre (TFA, opløsningsmiddel A) skylledes gennem kolonnerne indtil absorbansen ved 214 nm var nede på basislinieniveauer. På dette tidspunkt etableredes en lineær gradient, der førte fra 0 til 100% opløsningsmiddel B (acetonitril indeholdende 0,1% TFA) med en hastighed på 1% opløsningsmiddel B/minut og en strømningshastighed på 1 ml/minut.

Aktive fraktioner efter en enkelt HPLC-fase kombineredes, fortyndedes med to volumener 0,9 M eddikesyre og 0,2 M pyridin (pH 4,0 puffer A_2) og overførtes til samme kolonne efter genækvilibrering i pyridin-acetat opløsningsmiddelsystemet. En gradient af opløsningsmiddel B_2 (0,9 M eddikesyre, 0,2 M pyridin og 60% N-propanol) sattes så til kolonnen, der førte fra 0 til 20% opløsningsmiddel B_2 på 10 minutter og fra 20% B_2 til 84% B_2 på 100 minutter ved en strømningshastighed på 1 ml/minut.

Fraktioner indeholdende aktivitet fra denne anden HPLC-fase kombineredes, fortyndedes med to volumener opløsningsmiddel A_2 og sattes til en 3,9 mm x 30 cm radial PAK-kolonne pakket med 10 µm Vydac C-18 revers fase siliciumoxid, der forud var blevet ækvilibreret i 20% opløsningsmiddel B_2. En gradient af opløsningsmiddel B_2 fra 20% til 84% anvendtes til eluering af protein fra kolonnen. Fraktioner indeholdende aktivitet fra den tredje HPLC-fase fortyndedes med to volumener opløsningsmiddel A_1 (0,1% TFA) og sattes til C-18 kolonnen, der tidligere var blevet ækvilibreret i 20% opløsningsmiddel B_1 (acetonitril, 0,1% TFA), og en gradient af opløsningsmiddel B_1 etableret ud fra 20% til 100% B_1 med en ændringshastighed på 1% pr. minut og en strømningshastighed på 1 ml/minut anvendtes til eluering af IL-7.

SDS-PAGE udførtes ved en modifikation af den af Laemmli, Nature 227:680 (1970), beskrevne fremgangsmåde. Materiale, oprenset gennem fire RP-HPLC-faser, inddampedes til tørhed under vakuum i et lyofiliseringsapparat og genopløstes i et lille volumen SDS-prøvepuffer uden 2-mercaptoethanol. Prøven underkastedes elektroforese på en 12% polyacrylamidgel. Det passende spor af den resulterende gel blev skåret i afsnit på 1-2 mm, og hvert afsnit findeltes og elueredes ved diffusion natten over i 0,2% SDS, hvorefter den biologiske aktivitet i hver fraktion bestemtes. De aktive fraktioner kombineredes, og en del analyseredes efter

elektroforese på et Phastgel PAGE system (Pharmacia) under anvendelse af en 10-15% gradientgel. Proteiner synliggjordes under anvendelse af en sølvfarningsmetode.

I tabel 1 nedenfor sammenstilles resultaterne af de til rensning af IL-7 anvendte fremgangsmåder. Ved pH 8,0 og 100 mM NaCl bandt IL-7 aktiviteten i det koncentrerede medium fra IxN/A6-celler ikke til DEAE-Sephacel kolonnen, selvom 90% af det samlede protein, som var til stede i det rå konditionerede medium, inklusive det, som var ansvarligt for makrofagkolonistimuleringsaktivitet, bandt til kolonnen. Efterfølgende kromatografitrin, inklusive SP-Trisacryl, Blue B agarose og fire separate revers fase HPLC-protokoller resulterede i en 200.000-fold oprensning af IL-7 aktivitet.

Tabel 1

Oprensning af murin interleukin-7 (IL-7)

Trin	S.A. (enheder/µg)	Oprensning (-fold)	Udbytte (%)
1. Koncentrat	0,38	1	-
2. DEAE-Sephacel (ubundet)	4,63	12,2	100
3. SP-Trisacryl	153	403	113
4. Blue B agarose	423	1113	80
5. RP-HPLC	8×10^4	2×10^5	50
6. SDS-PAGE	4×10^6	10×10^6	35

Behandling af 800 l råt konditioneret medium på denne måde resulterede i fire HPLC-kolonnefraktioner, der indeholdt ialt 5×10^6 enheder IL-7 aktivitet. Analyse af dette materiale ved SDS-PAGE og sølvfarvning eller ^{125}I-mærkning afslørede, at et antal proteiner stadig var til stede på dette oprensningstrin. Hovedproteinet, som var til stede i dette materiale, udviste en masse på 18.000, dog kunne svage bånd over og under dette bånd påvises.

Der udførtes to forsøg for at identificere det protein i denne blanding, der var ansvarligt for IL-7 aktivitet. I første forsøg tilførtes IL-7 til SDS-PAGE under ikke-reducerende betingelser. Efter fuldførelse af elektroforese blev gelen skåret i 1 mm bånd, og proteinet i

hvert bånd elueredes i medier og analyseredes for biologisk aktivitet. Resultaterne viste, at den biologiske IL-7 aktivitet var forbundet med et protein med M_r=25.000 og var forskellig fra det område af gelen, der svarer til den, der indeholder M_r 18.000 proteinbåndet. Der isoleredes ingen aktivitet, når elektroforese udførtes under reducerende betingelser.

I det andet forsøg absorberedes ^{125}I-mærket IL-7 til celler, der reagerer på denne faktor (IxN/2b). IxN/2b er en klonal cellelinie stammende fra de-ikke adhærente præ-B-celler fra en langtidsknoglemarvskultur. Disse celler kan dyrkes i fravær af exogene fødeceller og er strengt afhængige af renset IL-7 for fortsat vækst og levedygtighed. Cellerne vaskedes og ekstraheredes så med PBS indeholdende 1% Triton X-100 (polyoxyethylenetheroverfladeaktivt middel, Rohm & Haas Co., Philadelphia, PA, USA). En del af dette materiale analyseredes så efter SDS-PAGE ved autoradiografi. Resultaterne viste, at kun et protein med M_r=25.000 syntes at binde til IL-7-responsive celler. Overskydende umærket IL-7 inhiberede binding af dette protein, og kontrolceller, der ikke reagerer på IL-7, bandt ikke til M_r 25.000 proteinet. Resultaterne af begge forsøg lod formode, at et protein med M_r=25.000 var ansvarligt for IL-7 aktivitet.

IL-7 aktivitetens modstandsdygtigheden over for SDS-PAGE lod formode, at denne fremgangsmåde kunne anvendes som det sidste trin ved oprensningen af dette protein. Resultaterne viste, at IL-7 aktiviteten som fundet i pilotforsøget eluerede på et sted, der stemte overens med et protein med M_r 25.000. PAGE-analyse af denne bioaktive fraktion afslørede et enkelt protein påvist ved sølvfarvning. Proteinsekvensbestemmelse ved Edman-nedbrydning under anvendelse af et Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) automatiseret sekvensbestemmelsesapparat viste følgende N-terminalaminosyresekvens: X-X-His-Ile-Lys-Asp-Lys-Glu-X-Lys-Ala-Tyr-Glu-X-Val-Met.

Den endelige specifikke aktivitet blev foreløbigt anslået til at være 4 x 10^6 enheder/µg protein, hvilket ville repræsentere en 10 million-fold oprensning i forhold til udgangsmaterialet. Af de tidligere anførte grunde er dette skøn blevet revideret i nedadgående retning til ca. 2 x 10^5 enheder/µg, ækvivalent med den specifikke aktivitet af homogen rekombinant murin IL-7 fremstillet i COS-7 celler.

Eksempel 2

Isolering af cDNA indkodende murin IL-7 ved direkte ekspression af aktivt protein i COS-7 celler

Et cDNA-bibliotek blev opbygget ved revers transkription af polyadenyleret mRNA isoleret fra total RNA ekstraheret fra IxN/A6-celler dyrket under IL-7-inducerende betingelser. Cellerne dyrkedes i RPMI 1640-medium plus 5% kalvefosterserum i 48 timer i nærvær af 10 ng/ml phorbolmyristylacetat (PMA) og 1 µg/ml S. typhimurium LPS til frembringelse af en maksimal IL-7 specifik budbringer-RNA-produktion. Celler høstedes under anvendelse af trypsin-EDTA og cytoplasma-RNA isoleret under en NP40-lysisprocedure, som i det væsentlige var identisk med den af Pennica et al., Nature 301:214 (1983) beskrevne. Poly A^+ RNA isoleredes ved oligo-dT-cellulosekromatografi, og dobbeltstrenget cDNA fremstilledes under anvendelse af revers transkriptase. Stump-endet cDNA ligeredes i SmaI-skåret dephosphoryleret pDC201-vektor-DNA.

Den eukaryotiske højekspressionsvektor pDC201 (se eksempel 7 og fig. 7) samledes ud fra SV40, adenovirus 2 og pBR322 DNA, der i rækkefølge omfattede (1) et SV40-fragment indeholdende replikationsområdet, tidlige og sene promotorer samt forstærker, (2) et adenovirus-2-fragment indeholdende den sene hovedpromotor, den første exon og en del af det første intron af den sene tredelte leder, (3) en syntetisk sekvens omfattende et Hind III sted, et splejsningsacceptorsted, anden og tredje exon af den tredelte adenovirus-2-leder og et multipelt kloningssted indeholdende et SmaI-sted, (4) yderligere SV40-sekvenser indeholdende tidlige og sene polyadenyleringssteder, (5) adenovirus-2-sekvenser omfattende de virus-associerede RNA-gener, og (6) pBR322-elementer til replikation i E. coli.

Det resulterende IxN/A6 cDNA-bibliotek i pDC201 blev anvendt til transformering af E. coli stamme DH5α, og rekombinanter udpladedes til tilvejebringelse af ca. 1000 kolonier pr. plade og tilstrækkeligt mange plader til at tilvejebringe ca. 50.000 totale kolonier pr. screen. Kolonier skrabedes fra hver plade, kombineredes, og plasmid-DNA fremstilledes ud fra hver pulje. Den kombinerede DNA anvendtes så til transfektion af et sammenflydende underlag af COS-7 abeceller under anvendelse af DEAE-dextran efterfulgt af chlorquin-behandling som beskrevet af Luthman et al., Nucleic Acids Res. 11:1295 (1983) og McCutchan et al., J. Natl. Cancer Inst. 41:351 (1968). Cellerne dyrkedes så i tre dage for at tillade forbigående ekspression af de indføjede sekvenser. Efter tre dage

blev cellekultursupernatanter analyseret for IL-7 aktivitet under anvendelse af den andetsteds i beskrivelsen beskrevne præ-B-celleproliferationsassay. Efter at ca. 720.000 rekombinanter fra biblioteket var blevet screenet på denne måde, blev det iagttaget, at en transfektantpulje frembragte IL-7 aktivitet i proliferationsassayen til et niveau 10-fold over baggrunden.

En nedfrosset lager af bakterier fra den positive pulje anvendtes så til opnåelse af plader med ca. 200 kolonier. Disse plader behandledes som før til opnåelse af plasmid-DNA fra de kombinerede bakteriekolonier, og DNA transficeredes i COS-7 celler som beskrevet ovenfor. Efter identifikation af en positiv pulje fremstilledes plasmid-DNA ud fra individuelle kolonier og screenedes igen ved COS-7 celletransfektion. På denne måde isoleredes en enkelt klon, som var i stand til at fremkalde ekspression af IL-7 i COS-7 celler. Indføjelsen subklonedes og sekvensbestemtes med konventionelle teknikker. Sekvensen er vist i fig. 2.

Eksempel 3

Isolering af cDNA, der indkoder human IL-7, og ekspression af aktivt protein i COS-7 celler

Indledende forsøg på at påvise human IL-7 mRNA på Northern blots under anvendelse af nick-translateret murin IL-7 cDNA slog fejl. Det var imidlertid muligt at opnå hydridisering af den murine probe til Southern blots af humant genom-DNA. Der påbegyndtes således en søgning efter et humant IL-7 cDNA ved først at screene et kommercielt tilgængeligt humant genombibliotek. Ca. 400.000 humane genomkloner screenedes med nick-translateret murin IL-7 cDNA under anvendelse af teknikker beskrevet af Benton og Davis, Science 196:180 (1977). Denne screening gav en enkelt hybridiserende klon, der blev oprenset og restriktionskortlagt. Southern blots af dette klonede genom-DNA viste, at hybridiseringen til den murine probe var begrænset til et 1,2 kb EcoRI-fragment. Dette fragment subklonedes og sekvensbestemtes, hvilket afslørede, at det svarede til det 5'-ikke-kodende område af genet, der strækker sig til de første 10 baser af kodningsområdet, hvorefter den humane genom-DNA var afvigende fra den murine IL-7 cDNA-sekvens p.g.a. tilstedeværelsen af en intron. Bestemmelsen af denne genomsekvens muliggjorde syntese af oligonukleotider med sekvenser, som er komplementære til det humane IL-7 RNA-transkript. To sådanne oligonukleotider med 29 og 31 baser fremstilledes, mærkedes med ^{32}P under anvendelse af T4-polynukleotidkinase og anvendtes til

probning af Nothern blots af RNA fra et antal humane cellelinier. Det blev fundet, at disse prober specifikt hydridiserer til to størrelsesklasser af mRNA fra en human leveradenocarcinomacellelinie, SK-HEP-1 (ATCC HTB 52).

Et cDNA-bibliotek opbyggedes ved revers transkription af polyadenyleret mRNA isoleret fra total RNA, der var blevet ekstraheret fra SK-HEP-1. Cellerne dyrkedes i RPMI 1640 medium plus 10% kalvefosterserum i 16 timer i nærvær af 1 µg/ml LPS til fremkaldelse af hIL-7 mRNA-syntese. Polyadenyleret mRNA isoleredes ved kromatografi på oligo-dT cellulose og revers-transkriberedes under anvendelse af standardteknikker til tilvejebringelse af en første cDNA-streng. Dette cDNA gjordes dobbeltstrenget under anvendelse af DNA-polymerase I, stumpendet med T4 DNA-polymerase, methyleredes med EcoRI-methylase til beskyttelse af EcoRI-spaltningssteder inden i cDNA'et og ligeredes til EcoRI-linkere. De resulterende konstruktioner blev nedbrudt med EcoRI til fjernelse af alle linkere med undtagelse af en kopi ved hver cDNA-ende og ligeredes til EcoRI-skårne og dephosphorylerede arme af bakteriofag λgt10 (Huynh et al., DNA Cloning: A Practical Approach, Glover, ed., IRL Press, pp. 49-78). Det ligerede DNA pakkedes i fagpartikler under anvendelse af et kommercielt tilgængeligt sæt til dannelse af et rekombinantbibliotek (Stratagene Cloning Systems, San Diego, CA, USA). Rekombinanter udpladedes på E. coli stamme C600 (hfl^-) og screenedes ved standard plaquehybridiseringsteknikker under moderat strenge betingelser (50°C, 0,9 M NaCl) under anvendelse af samme kinase-oligonukleotider, som hybridiserede til mRNA'et. Ved screening af ca. 150.000 plaquer blev en klon, der hybridiseredes til proberne, når filtrene vaskedes med 1xSSC ved 55°C, isoleret fra biblioteket. Denne klon (hIL-7 cDNA #1) plaque-rensedes, og det indføjede DNA oprensedes og subklonedes i et EcoRI-skåret derivat (pGEMBL18) af standard kloningsvektoren pBR322 indeholdende en polylinker med et unikt EcoRI-sted, et BamHI-sted og talrige andre unikke restriktionssteder. Et eksempel på en vektor af denne type er beskrevet af Dente et al., Nucleic Acids Research 11:1645 (1983).

Dette cDNA blev så sekvensbestemt og viste sig at have en længde på 1465 basepar, med en åben læseramme, som var i stand til at kode for et protein med 133 aminosyrer. Både DNA og aminosyresekvensen af dette humane cDNA udviste ca. 78% homologi med det murine IL-7 cDNA. Når dette humane cDNA imidlertid subklonedes i SmaI-stedet af pDC201 for at muliggøre dens ekspression i COS-7 celler blev der efter transfektion ikke

påvist IL-7 aktivitet i kultursupernantanterne.

Til opnåelse af yderligere humane IL-7 cDNA screenedes ca. 1 million λgt10-bakteriofag indeholdende cDNA'er stammende fra SK-HEP-1 poly A^+ RNA under anvendelse af nick-translateret human IL-7 cDNA #1. Dette resulterede i isoleringen af 5 yderligere cDNA'er, der så blev indføjet på SmaI-stedet af pDC201. Disse konstruktioner transficeredes så i COS-7 celler, og kultursupernatanterne analyseredes for IL-7 aktivitet. Et cDNA, betegnet hIL-7 #3, udviste påviselig IL-7 aktivitet. Dette cDNA subklonedes i pGEMBL18 og sekvensbestemtes. cDNA-sekvensen er vist i fig. 4, kodningssekvensen og den afledte aminosyresekvens af hIL-7 er vist i fig. 5.

Eksempel 4

Ekspression af murin IL-7 i et gærsystem

Til frembringelse af en gærekspressionsvektor for mIL-7, ændredes gærplasmid pBC10, som er et derivat og ækvivalent af pYαHuGM (ATCC 53157), på følgende måde. pBC10 er en gær/bakterie-shuttlevektor omfattende (1) et replikationsområde og et Amp^r-gen fra pBR322, der muliggør udvælgelse af replikation i E. coli, (2) TRP1-genet og 2μ replikationsområdet for udvælgelse og replikation i S. cerevisiae, (3) gæralkoholdehydrogenase 2 (ADH2) promotoren efterfulgt af gær præ-pro α-faktor ledersekvensen for at muliggøre ekspression af fremmed protein og udskillelse fra gær, og (4) et multipelt kloningssted omfattende et SpeI-sted. pBC10 blev fuldstændigt nedbrudt med Asp718 og SpeI, vektorfragmentet isoleredes og ligeredes til det efterfølgende oligonukleotid A, der tilvejebringer en N-terminal epitop eller identifikationsleder Asp-Tyr-Lys-(Asp_4)-Lys ("flag") fusioneret ved siden af og i ramme med α-faktor ledersekvensen, efterfulgt af et faktor X proteasegenkendelsessted, og en polylinkersekvens omfattende StuI-, NcoI-, BamHI-, SmaI- og SpeI-spaltningssteder:

Asp718↓ ↓α-faktor-behandling

```
5'-GTA CCT TTG GAT AAA AGA GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GAA ...
    3'-GA AAC CTA TTT TCT CTG ATG TTC CTG CTG CTA CTG TTC CTT ...
                        Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Glu ...
```

"flag'"-epitop

```
                    ↓StuI ↓NcoI          ↓SmaI   ↓SpeI
....ATC GAA GGT AGG CCT CCA TGG ATC CCC CGG GAC A-3'
....TAG CTT CCA TCC GGA GGT ACC TAG GGG GCC CTG TGA TC-5'
....Ile Glu Gly Arg Pro      ↑BamHl
```

Faktor X sted polylinker

Den resulterende konstruktion, betegnet pIXY166, blev så nedbrudt med StuI og SpeI, og vektoren ligeredes til et ≈950 bp NdeI-XbaI fragment omfattende hovedparten af kodningsområdet af mIL-7 cDNA, og den efterfølgende oligonukleotidlinker, der tilbageføjer de N-terminale 11 aminosyrer af den modne sekvens af mIL-7 op til det indre NdeI-sted:

```
5'-GAG TGC CAC ATT AAA GAC AAA GAA GGT AAA GCA-3'
3'-CTC ACG GTG TAA TTT CTG TTT CTT CCA TTT CGT AT-5'
   Glu Cys His Ile Lys Asp Lys Glu Gly Lys Ala
```

Denne ekspressionsvektor, betegnet pIXY171, blev oprenset og anvendt til transformering af en diploid gærstamme af S. cerevisiae (XV2181) ved standardteknikker såsom de i EPA 0165654 beskrevne, idet der udvalgtes for tryptophanprototropher. De resulterende transformanter dyrkedes for ekspression af et flag-mIL-7 fusionsprotein. Kulturer til analyse for biologisk aktivitet dyrkedes i 20-50 ml YPD-medium (1% gærekstrakt, 2% pepton, 1% glucose) ved 37°C til en celletæthed på 1-5 x 10^8 celler/ml. Cellerne fjernedes så ved centrifugering, og mediet filtreredes gennem et 0,45 μm celluloseacetatfilter. Af den transformerede gærstamme fremstillede supernatanter underkastedes så analyse ved omsætning med et monoklonalt museantistof efterfulgt af peberrodsperoxidase-konjugeret gede-antimuse-antistof til påvisning af tilstedeværelsen af flag-peptidet, og analyseredes også ved præ-B-celle proliferations-

assay for IL-7 aktivitet, hvilket bekræftede ekspression af et biologisk aktivt protein.

Eksempel 5

Ekspression af human IL-7 i gær

For ekspression af hIL-7 blev en gærekspressionsvektor stammende fra pIXY120 opbygget som følger. pIXY120 er identisk med pYαHuGM (ATCC 53157) med undtagelse af, at den ikke indeholder noget cDNA-indskud og omfatter et polylinker/multipelt kloningssted med et NcoI-sted. Denne vektor omfatter DNA-sekvenser fra følgende kilder: (1) et stort SphI (nukleotid 562) til EcoRI (nukleotid 4361) fragment udskåret fra plasmid pBR322 (ATCC 37017), indbefattende replikationsområdet og ampicillinresistensmarkøren for udvælgelse i E. coli, (2) S. cerevisiae DNA omfattende TRP-1 markøren, 2μ replikationsområdet, ADH2-promotoren, og (3) DNA, der indkoder et signalpeptid med 85 aminosyrer stammende fra genet, der indkoder den udskilte peptid α-faktor (se Kurjan et al., US-patentskrift nr. 4.546.082). Et Asp718-restriktionssted blev indført ved position 237 i α-faktor signalpeptidet for at lette fusion til heterologe gener. Dette tilvejebragtes ved ændring af thymidinresten ved nukleotid 241 til en cytosinrest ved oligonukleotid-styret in vitro mutagenese som beskrevet af Craik, Biotechniques, januar 1985, 12-19. Et syntetisk oligonukleotid indeholdende multiple kloningssteder og med følgende sekvens blev indføjet fra Asp718-stedet ved aminosyre 79 nær ved 3'-enden af α-faktor signalpeptidet til et SpeI-sted i 2μ-sekvensen:

```
Asp718                                          StuI  NcoI  BamHI
GTACCTTTGGATAAAAGAGACTACAAGGACGACGATGACAAGAGGCCTCCATGGAT...
   GAAACCTATTTTCTCTGATGTTCCTGCTGCTACTGTTCTCCGGAGGTACCTA...
                                                |←——Polylinker—

   SmaI      SpeI
...CCCCCGGGACA
...GGGGGCCCTGTGATC
——Polylinker——→|
```

pBC120 adskiller sig også fra pYαHuGM ved tilstedeværelsen af et 514 bp DNA-fragment stammende fra den enkeltstrengede fag f1, der indeholder replikationsområdet og det intergeniske område, som er blevet indføjet ved NruI-stedet i pBR322-sekvensen. Tilstedeværelsen af et f1 replikationsområde tillader frembringelse af enkeltstrengede DNA-kopier af vektoren ved transformering i passende stammer af E. coli og superin-

fektion med bakteriofag f1, hvilket letter DNA-sekvensbestemmelse af vektoren og tilvejebringer en basis for in vitro mutagenese. Til indføjelse af et cDNA nedbrydes pIXY120 med Asp718, der spalter i nærheden af 3'-enden af α-faktor lederpeptidet (nukleotid 237), og fx. NcoI, der spalter i polylinkeren. Det store vektorfragment oprenses dernæst og ligeres til et DNA-fragment, der indkoder proteinet, som skal udtrykkes.

Til frembringelse af en udskillelsesvektor for ekspression af human IL-7 udskæres et cDNA-fragment, der indkoder hIL-7 fra ClaI-stedet (se fig. 1) til et NcoI-sted ved 3'-enden af den åbne læseramme, fra en cDNA, der indeholder den fuldstændige hIL-7 sekvens. pIXY120 nedbrydes med Asp718 nær ved 3'-enden af α-faktorlederen og NcoI. Vektorfragmentet ligeres til ClaI-NcoI hIL-7 cDNA-fragmentet og det efterfølgende oligonukleotid, der gendanner de sidste fem aminosyrer af α-faktorlederen og de første 20 aminosyrer af moden hIL-7.

α-faktorbehandling---↓ EcoRV

```
GTA CCT TTG GAT AAA AGA GAT TGT GAT ATC GAA GGT AAA GAT GGC ...
 GA AAC CTA TTT TCT CTA ACA CTA TAG CTT CCA TTT CTA CCG ...
Pro Leu Asp Lys Arg Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly ...
                  |←———hIL-7——→
```

```
... AAA CAA TAT GAG AGT GTT CTA ATG GTC AGC AT
... TTT CTT ATA CTC TCA CAA GAT TAC CAG TCG TAG C
    Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile
```

Oligonukleotidet indeholder også en T->C ændring ved nukleotid 12 til indføring af et EcoRV-restriktionssted, uden at ændre den indkodede aminosyresekvens. Den resulterende hIL-7 ekspressionsvektor betegnes pIXY192.

Til frembringelse af en intracellulær ekspressionsvektor for hIL-7 produktion i S. cerevisiae nedbrydes pIXY120 med XhoI (der spalter 5'-enden af α-faktorledersekvensen) og NcoI til fjernelse af DNA-sekvensen, der indkoder lederen. Vektorfragmentet isoleres og ligeres til et EcoRV-NcoI-fragment, der indkoder hIL-7 fra nukleotid 12 stammende fra pIXY192 (som beskrevet ovenfor) og det efterfølgende oligonukleotid:

T CGA GAC AAA ATG GAT TGT GA
CTG TTT TAC CTA ACA CT
Met Asp Cys Asp

Dette oligonukleotid binder moden hIL-7 til gær-ADH2-promotoren og tilvejebringer en initiatormethioninkodon og de første tre aminosyrer af moden hIL-7 op til EcoRV-stedet. Den resulterende vektor betegnes pIXY193.

De foregående ekspressionsvektorer oprenses så og anvendes til transformering af en diploid gærstamme af S. cerevisiae (XV2181) ved standardteknikker såsom de i EPA 165.654 beskrevne, der udvælger for tryptophanprototropher. De resulterende transformanter dyrkes for ekspression af et hIL-7 protein enden intracellulært eller som et udskilt protein. Kulturer, som skal analyseredes for biologisk aktivitet, dyrkes i 20-50 ml YPD-medium (1% gærekstrakt, 2% pepton, 1% glucose) ved 37°C til en celletæthed på 1-5 x 10^8 celler/ml. Til adskillelse af celler fra medium fjernes celler ved centrifugering, og mediet filtreres gennem et 0,45 μ celluloseacetatfilter før analyse. De af den pIXY192-transformerede gærstamme fremstillede supernatanter eller rå ekstrakter fremstillet ud fra brudte, med pIXY193 transformerede gærceller, underkastes analyse under anvendelse af præ-B-celle proliferationsassayen for IL-7 aktivitet til verifikation af ekspressionen af et biologisk aktivt protein.

Eksempel 6

Ekspression af murin IL-7 i E. coli

Moden mIL-7 blev udtrykt intracellulært i E. coli ved anbringelse af kodningsområdet nedenstrøms for bakteriofag λ til venstre for promotor P_L. Den af plasmidet producerede mRNA indeholder et samstemmende ribosombindingssted og ATG (initiatormethioninkodon). Ekspressionsplasmidet blev opbygget som følger. For det første blev plasmid pLNbIL2 (ATCC 53202, se EPA 215.576) nedbrudt med XbaI og StuI, og det resulterende 5,2 kb vektorfragment blev udvundet. For det andet syntetiseredes et syntetisk oligonukleotid til binding af den transkriptionelle enhed af det afkortede N-gen af fag lambda til et samstemmende ribosombindingssted (cRBS) og kodningsområdet af mIL-7 op til NdeI-stedet (se fig. 1). Dette oligonukleotid havde følgende sekvens:

```
(XbaI) BglII   cRBS
CTAGATCTCT AAGGAGGTAAAAAAAT ATG GAA TGT CAT ATT AAA GAT AAA GAA GGT ...
TAGAGA TTCCTCCATTTTTTTA TAC CTT ACA GTA TAA TTT CTA TTT CTT CCA ...
                        Met Glu Cys His Ile Lys Asp Lys Glu Gly ...

          (NdeI)
... AAA GCA
... TTT CGTAT
... Lys Ala
```

For det tredje blev et restriktionsfragment indeholdende hovedparten af mIL-7 kodningsområdet udvundet fra klonen, der var blevet isoleret ved NdeI- og PvuII-nedbrydning som beskrevet i eksempel 2. De foregående tre fragmenter ligeredes sammen til tilvejebringelse af et ekspressionsplasmid betegnet pLNPBGF. Dette plasmid anvendtes til transformering af E. coli stamme K802:pRK248cIts (ATCC 33526, ATCC 33766), der så dyrkedes i superinduktionsmedium (se Mott et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:88 (1985)). Ekspression af den rekombinante transkriptionelle enhed blev fremkaldt ved ændring af dyrkningstemperaturen fra 30°C til 42°C, når kulturerne nåede en OD_{600} på ca. 0,5, og henstilling ved denne temperatur i ca. to timer. På dette tidspunkt høstedes cellerne, og den resulterende cellepellet opløstes i en ekstraktionspuffer bestående af (for en pille svarende til 1 ml kultur) 0,5 ml 7 M guanidin, HCl, 10 mM citrat pH 7,0, 5 mM EDTA, 0,1% β-mercaptoethanol og 0,1% Triton X100. Den resulterende fuldt denaturerede celleekstrakt fortyndedes så hurtigt (1 del pr. 100) i vævskulturmedium (RPMI 1640) indeholdende 1% bovinserumalbumin. Denne fremgangsmåde resulterede i ekspression af 20-50.000 enheder aktivitet pr. ml celleekstrakt.

mIL-7 ekspressionsniveauet forbedredes ca. 100-fold ved overførsel af et restriktionsfragment fra pLNPBGF, der indkoder proteinet i et plasmid indholdende et afkortet ikke-kodende 5'-område. Dette ekspressionsplasmid (betegnet pPLlppPBGF) blev opbygget ud fra plasmid pPL3 som følger. pPL3 er et derivat af det kommercielt tilgængelige plasmid pGEM1 (Promega Biotec, Madison, WI, USA) indeholdende en temperaturfølsom λ P_L-promotor, der i det væsentlige ligner den, der er beskrevet detaljeret af Gourse et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1069 (1985). Lignende λ P_L-promotorsekvenser er til stede på plasmiderne pHUB2, der forekommer i E. coli stamme JMB9 (ATCC 37092), og pPLc28, der forekommer i E. coli RR1 (ATCC 53082). pPL3 blev nedbrudt med HindIII, det resulterende lineariserede plasmid blev gjort stump-endet med T4 polymerase og derefter nedbrudt med Asp718. Derefter fremstilledes et syntetisk oligonukleotid med følgende sekvens:

(Asp718) (XbaI)
GTACCGCTACATGGAGATTAACTCAAT
GCGATGTACCTCTAATTGTGTTAGATC.

Et restriktionsfragment fra pLNPBGF indeholdende hele kodningsområdet blev fremstillet ved nedbrydning med XbaI og SspI. De foregående elementer blev ligeret sammen under anvendelse af standardteknikker, og det resulterende plasmid pPLlppPBGF anvendt til transformering af K802:pRK248clts. Når denne stamme blev induceret som beskrevet ovenfor blev der frambragt ca. 2,5-3,2 millioner enheder af præ-B-cellevækstfremmende aktivitet pr. ml kulturmedium i celleekstrakter fremstillet som beskrevet ovenfor. Desuden viste SDS-PAGE et tæt farvet proteinbånd i en position, der stemte overens med molekylvægten af moden mIL-7.

Eksempel 7

Ekspression af rekombinant human IL-7 under anvendelse af højeffektive mammale ekspressionssystemer

Det i fig. 7 afbildede mammale ekspressionsplasmid pDC201 er udformet således, at det udtrykker cDNA-sekvenser indføjet ved dets multiple kloningssted (MCS) ved transfektion i mammale celler. Idet der nu henvises til fig. 7, omfatter pDC201 følgende komponenter: SV40 (skraveret felt) indeholder SV40-sekvenser fra koordinater 5171-270 inklusive replikationsområdet, forstærkersekvenser og tidlige og sene promotorer. Fragmentet er orienteret således, at transkriptionsretningen fra den tidlige promotor er som vist med pilen. Ad-MLP (uskraveret felt) indeholder adenovirus-2-sekvenser fra koordinater 5779-6231 inklusive den sene hovedpromotor, den første exon og en del af intronet mellem den første og anden exon i den tredelte leder. TPL (prikket felt) indeholder en syntetisk DNA-sekvens, der specificerer adenovirus-2-sekvenser 7056-7172, 9634-9693 (indeholdende acceptorsplejsningsstedet af den anden exon i den tredelte leder, den anden exon og en del af den tredje exon i den tredelte leder) og et multipelt kloningssted (MCS) indeholdende steder for KpnI, SmaI og BglII. pA (skraveret felt) indeholder SV40-sekvenser fra 4127-4100 og 2770-2533, der omfatter polyadenylerings- og afslutningssignalerne for tidlig transkription. VA (sort felt) indeholder adenovirus-2-sekvenser fra 10226-11555, der omfatter de virus-associerede RNA-gener (VAI og VAII), og et NheI-sted, der er beliggende ca. 570

basepar nedenstrøms for MCS. De fuldt optrukne linier stammer fra pBR322 og repræsenterer (begyndende efter pA-sekvenserne og i retning med uret) koordinater 29-23, 651-185 (på dette sted indføjes VA-sekvenserne), 29-1, 4363-2486 og 1094-375. pDC201 er et derivat af pMLSV, der tidligere er beskrevet af Cosman et al., Nature 312:768 (1984).

COS-7-celler dyrkes og transficeres som beskrevet af Cosman et al., ovenfor, med plasmid-DNA fra en 1,5 ml kultur af E. coli DH5α (rec A⁻), som er transformeret med SmaI-udskåret pDC201 omfattende en indføjet hIL-7 cDNA (se eksempel 3 ovenfor). I en foretrukket udførelsesform anvendes en til en human IL-2-receptor (p55, Tac-antigen) signalsekvens splejset hIL-7 cDNA til forøgelse af udskillelsen af rekombinant hIL-7 fra transficerede COS-7 celler.

I denne udførelsesform bliver pDC201-plasmidet, som har hIL-7 cDNA-indføjelsen, udskåret med ClaI og NheI, og det resulterende ClaI-NheI-fragment (indeholdende den C-terminale del af den humane IL-7 kodningssekvens) ligeres til det efterfølgende oligonukleotid, der regenererer sekvensen, som indkoder de første 19 aminosyrer af moden human IL-7 op til og indbefattende et internt ClaI-sted:

```
                EcoRV
      AT TGT GAT ATC GAA GGT AAA GAT GGC AAA CAA TAT GAG...
      TA ACA CTA TAG CTT CCA TTT CTA CCG TTT GTT ATA CTC...
    Asp Cys Asp Ile Glu Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu...

                                        ClaI
  ..-AGT GTT CTA ATG GTC AGC AT ----
  ...TCA CAA GAT TAC CAG TCG TAGC
  ...Ser Val Leu Met Val Ser.
```

Et PvuII-XbaI-fragment af en human IL-2 receptor-cDNA udskæres så fra pMLSV-N1/N4-S (ATCC 39890, se EPA 162.699 og Cosman et al., ovenfor). Dette plasmid omfatter et PvuII-sted lige ovenstrøms for det i de anførte publikationer beskrevne PstI-sted. PvuII-XbaI-fragmentet isoleres og gøres stumpt med T4 DNA polymerase og ligeres til BamHI-linkere. Dette fragment klones så i en BglII-udskåret intermediær vektor. Efter spaltning med BamHI isoleres det resulterende fragment og klones i BglII-udskåret pDC201 til opnåelse af pDC201/IL-2R. Til splejsning af IL-2 receptorlederen til moden hIL-7 udskæres pDC201/IL-2R med SstI, gøres stump og udskæres så med NheI, og det resulterende vektorfragment ligeres til hIL-7-fragmentet, der blev samlet under anvendelse af det foregående oligonukleotid. Når den resulterende vektor transficeres i

COS-7 celler, fremkalder den en midlertidig ekspression af hIL-7 på højt niveau.

Et alternativt mammalt celleekspressionssystem for human IL-7 samles ved indføjelse af den foregående IL-2R/IL-7-konstruktion i en stabil mammal ekspressionsvektor indeholdende en valgbar markør, der så indføres i nyreceller (BHK) fra babyhamstere. Ekspressionsvektoren opbygges som følger. Et SmaI-HincII cDNA-fragment udskæres fra det foregående som ovenfor beskrevet samlede pDC201/hIL-2R/hIL-7 plasmid og klones i det reparerede (Klenow-polymerase) BamHI-sted af en mammal ekspressionsvektor, der omfatter et SV40 replikationsområde og en viral forstærkersekvens bundet til en musemetallothioneinpromotor (MT-1). Se Palmiter et al., US-patentskrift nr. 4.579.821. Denne hybridpromotor udviser et højt niveau af stabil, konstitutiv ekspression i mange forskellige mammale celletyper. pNPV1 indeholder også den normale dihydrofolatreduktase (DHFR) DNA-sekvens, der muliggør methotrexatudvælgelse for mammale celler, der indeholder dette plasmid. DHFR-sekvensforstærkningsforekomster i sådanne celler kan udvælges ved anvendelse af forhøjede methotrexatkoncentrationer. På denne måde forstærkes generelt også de tilstødende DNA-sekvenser, hvilket resulterer i forstærket ekspression.

Udvælgelse og ekspression udførtes under anvendelse af adhærent BHKtk-ts 13 celler (ATCC CRL 1632), beskrevet af Waechter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1106 (1982), og Talavera et al., J. Cell Physiol. 92:425 (1977). Disse celler er i stand til både høj mannose- og kompleks oligosaccharidproteinmodifikation (se Hsieh et al., J. Biol. Chem. 258:2548 (1983)). Efter linearisering af ekspressionsplasmidet med SalI indføres DNA i BHK-celler ved elektroporation ved 300 V ved 960 mikrofarad. Egnede elektroporationsteknikker er beskrevet af Ausubel et al., eds., ovenfor, ved 9.3.1. Efter 48 timer indførtes 1 mikromol methotrexat i kulturmediet, og resistente kolonier udvalgtes efter et tidsrum på to uger. Repræsentative kloner underkastedes bioanalyse for udskillelse af hIL-7 i kultursupernatantfraktionen. De højeste ekspressionskloner underkastedes så yderligere udvælgelsesforskrifter under anvendelse af 10, 20 og 50 mikromol methotrexat. Resistente kolonier analyseredes yderligere til identifikation af kloner med højt ekspressionsniveau. De under dette forsøg udvalgte BHK-linier er adhærente celler, og der kan udtænkes systemer til opskaleret produktion, der enten involverer dyrkning i suspension under anvendelse af perler eller dyrkning i bioreaktorer under anvendelse af hulfiberteknik. BHK-celler kan let til-

passes dyrkning som suspensionsceller.

Eksempel 8

Anvendelse af IL-7 til stimulering af proliferation af umodne T-celler og thymocytter

Til påvisning af, at IL-7 stimulerer proliferation af forskellige T-celleslægter og -stadier dyrkedes thymocytter fra føtale og voksne mus i nærvær af urensede og rensede præparater af rekombinant murin IL-7.

Thymus, som er ansvarlig for udviklingen og/eller differentiering en af den cellulære immunrespons, udgøres af en heterogen population af T-celler. Det overvejende flertal, ca. 80-85% af cellerne, er fænotypisk enestående ($CD4^+/CD8^+$) og funktionelt uegnet. I thymus forefindes også mere modne celler, både funktionelt og fænotypisk. Disse celler eller enkelte positive ($CD4^+/CD8^-$ eller $CD4^-/CD8^+$) omfatter ca. 5-10% af thymocytterne og er i stand til at reagere på forskellige immunologiske stimuli. Der forefindes også en population af $CD4^-/CD8^-$celler i thymus, som antages for at være den tidligste celle i T-celle-ontogenesen. I $CD4^-/CD8^-$ underklassen findes celler, som er i stand til at repopulere thymus hos immunkompromitterede recipienter og foranledige andre thymocytpopulationer.

Det er kendt, at tidlige thymocytter, fx. $L3T4^-/Lyt2^-$ eller $CD4^-/CD8^-$ celler, kan repopulere thymus hos bestrålede recipienter og differentiere til de forskellige thymocytunderpopulationer (dvs. $CD4^+/CD8^-$, $CD4^-/CD8^+$ og $CD4^+/CD8^+$). Til bestemmelse af virkningerne af IL-7 på thymocytproliferation inkuberedes forskellige thymocytpræparater i nærvær af oprenset mIL-7 og [^{3}H]-thymidin, og de relative niveauer af inkorporeret radioaktivitet måltes ved scintillationstælling. I de følgende forsøgsrækker fremstilledes kultursupernatanter, der indeholdt IL-7 stammende fra en COS-7 cellelinie, som var transformeret med en ekspressionsvektor omfattende et murint IL-7 cDNA, som beskrevet i eksempel 3. Disse supernatanter anvendtes direkte eller oprenses til en enkelt proteintype på 25 kd som nærmere beskrevet i eksempel 1. Efter oprensning havde den rekombinante mIL-7 en specifik aktivitet på ca. 8×10^5 enheder/mg protein.

I thymocytproliferationsanalysen dyrkedes voksne C3H/HeJ- eller C57BL/6J-thymocytter ved en tæthed på 10^6 celler/brønd på fladbundede Costar mikrotiterplader med 96 brønde (Cambridge, MA, USA) i RPMI-1640 medium suppleret med 10% kalvefosterserum, 5×10^{-5} M 2-mercaptoethanol,

50 µg/ml glutamin, til et slutvolumen på 0,2 ml. Rekombinant murin IL-2 sattes til kulturerne ved en koncentration på 50 ng/ml, mens rIL-7 tilsattes i en 1:50 fortynding af rå COS-7 supernatant indeholdende ca. 1,25 ng/ml mIL-7. ^{3}H-thymidin sattes til kulturbrøndene i de sidste 6 timer af en 72 timers kultur. Data er udtrykt i tælleværdier pr. minut (cpm) i tabel 2 nedenfor, som det aritmetiske gennemsnit af firdobbelte analyser.

De mitogene evner af IL-7 bedømtes på de tidligste T-celler, eller thy$^+$ CD4$^-$/CD8$^-$ thymocytter, både alene og i nærvær af Con A. Der anvendtes to kilder for CD4$^-$/CD8$^-$ thymocytter. CD4$^-$/CD8$^-$ thymocytterne opnåedes fra voksne thymus ved negativ udvælgelse under anvendelse af antistof og komplement-medieret cytolyse. Voksne C57BL/6J-thymocytter inkuberedes ved 4°C i 45 minutter med lige volumener af anti-L3T4 og anti-Lyt2 mAb. Efter denne inkubation centrifugeredes cellerne, supernatanten opsugedes og cellerne resuspenderedes i kultursupernatanten af Mar 18,5 cellelinien (anti-rotte kappa-kæde mAb) (American Type Tissue Center, Rockville, MD, USA) (1 ml/10^7 celler) i 30 minutter ved 4°C. Efter centrifugering resuspenderedes cellerne i en 1:10 fortynding af kaninkomplement og inkuberedes i 30 minutter ved 37°C. Cellerne vaskedes en gang, og de levedygtige celler isoleredes ved centrifugering gennem en diskontinuert tæthedsgradient. De resulterende celler udgjorde ca. 0,1% af cellerne ved starten. Cellerne havde en levedygtighed på mere end 98%, og analyse af CD4– og CD8-ekspression ved immunfluorescensfarvning og flowcytometri viste, at de var mindre end 4% CD4$^+$ eller CD8$^+$.

CD4$^-$/DC8$^-$ thymocytter opnåedes også som føtale trettendedags-thymocytter, der fortrinsvis består af (>99%) CD4$^-$/CD8$^-$ Thyl$^+$ celler. Føtale trettendedags-thymocytter (idet dag 0 er den første dag for vaginal prop) dyrkedes ved en tæthed på 5 x 10^4 celler/brønd i rundbundede plader iht. den af Raulet, Nature 314:101 (1985), beskrevne fremgangsmåde. Når disse celler blev dyrket med rekombinant IL-7 iagttoges en proliferationsrespons som vist i tabel 2. CD4$^-$/CD8$^-$ thymocytter kan proliferere som en reaktion på IL-7 i fravær af comitogen.

Tilsætningen af plantelectinconcanavalin A (Con A, 2,5 µg/ml) til kulturerne forstærkede mærkbart responsen af CD4$^-$/CD8$^-$ thymocytter over for IL-2 og IL-7. Voksne CD4$^-$/CD8$^-$ celler reagerede ganske kraftigt på Con A alene, mens tilsætningen af IL-2 til kulturerne gav en trefold proliferationsforøgelse. Tilsætningen af IL-7 mere end fordoblede proli-

ferationsresponsen for disse celler. Føtale thymocytter reagerede ikke i nogen målelig grad på Con A alene, men i nærvær af IL-2 eller IL-7 iagttoges en signifikant proliferation. Disse data viser, at celler på det mindst modne intrathymiske T-celledifferentieringstrin kan stimuleres til proliferation med IL-7, hvilket viser dette cytokins rolle ved T-celledifferentiering og -modning.

Tabel 2

IL-7-drevet proliferation af voksne og føtale thymocytter

(middel cpm/kulturbrønd x 10^{-3} ved thymocytproliferationsanalyse)

Thymocytter	Con A	Kulturtilsætninger Ingen	IL-2	IL-7
Voksen $CD4^-/CD8^-$	-	0,7	19,1	11,7
	+	43,3	130,3	98,4
Føtal trettendedags	-	0,6	11,5	6,7
	+	1,0	23,3	12,9

Den relative effektivitet af IL-7 som en T-cellemitogen blev også undersøgt, både alene og i nærvær af en co-mitogen stimulus, PHA, og sammenlignet med to andre T-cellevækstfaktorer, Interleukin-2 (IL-2) og Interleukin-4 (IL-4). Både IL-2 og IL-7 stimulerede thymocytproliferation direkte, IL-2 var imidlertid ti gange mere aktiv på vægtbasis end IL-7. Selv ved koncentrationer så høje som 1 µg/ml var IL-4 et dårligt mitogen for thymocytkulturer. Når imidlertid lectinet fytohæmaglutinin (PHA) sattes til kulturerne til en slutkoncentration på 1% (volumen/volumen), iagttoges en markant forøgelse i IL-2-, IL-4- og IL-7-afhængig proliferation.

IL-7 virker uafhængigt af IL-2, IL-4 eller PHA ved stimulering af thymocytproliferation. For eksempel forøgede IL-7 (ved ca. 1-2 ng pr. ml) proliferationsresponsen signifikant ved IL-2-koncentrationer, der var mættende for thymocytproliferation (1-1000 ng/ml), hvilket resulterede i en ca. 50% forøgelse af tritieret thymidininkorporation. På lignende måde iagttoges også en forøgelse i IL-4-afhængig proliferation i nærvær af IL-7. IL-7-drevet proliferation af thymocytter blev desuden ikke inhiberet af monoklonalt anti-IL-2-receptorantistof ved koncen-

trationer, der muliggjorde inhibering af IL-2-drevet thymocytproliferation. Et monoklonalt anti-mIL-4-antistof inhiberede heller ikke IL-7's evne til at inducere thymocytproliferation.

De foregående forsøg viser, at IL-7 er i stand til at stimulere proliferationen af umodne T-celler og også er en kraftig co-stimulator for modne T-celler i nærvær af et mitogen.

Eksempel 9

Administrering af IL-7 til normale mus

Der udførtes en række forsøg til bestemmelse af virkningerne af intraperitoneal administrering af mIL-7 til normale C57BL/6J-mus (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA). Murin IL-7, fremstillet ved COS-7 celleekspression som beskrevet i eksempel 3, blev administreret på dag 0 til 4. Cellularitet, funktion og celleoverfladeantigenfænotype i milten, den peritoneale kavitet, perifert blod, thymus og knoglemarv undersøgtes på dag 5 og 8, ved doseringer på 40 ng, 200 ng og 1 µg pr. dyr under anvendelse af 5 mus pr. doseringsgruppe.

Knoglemarvsgranulocyt/makrofagkolonidannende enheder (CFU-GM) forhøjedes på dag 8 i mus, der modtog alle doser af IL-7, idet 40 ng gruppen udviste den maksimale forøgelse i sammenligning med kontrolmus, der kun modtog excipiens. På lignende måde forøgedes på IL-7 reagerende marvceller i de samme mus, idet den maksimale virkning optrådte i 40 ng gruppen. Knoglemarvsmegakaryocyt-CFU (CFU-MK) forøgedes i alle doseringsgrupper og var maksimal (3 x over kontrolgrupperne) på dag 8 i mus, der modtog 200 ng. I milten forøgedes CFU-GM kun i mus, der modtog den højeste IL-7 dosis.

Perifert blodcellularitet forøgedes 1,5 til 2,5 x på dag 5 i alle dosisgrupper og forblev ved ca. 2,5 x i den høje dosisgruppe på dag 8. Lignende kinetik iagttoges for cellularitet i den peritoneale kavitet, men forøgelser var her op til 3,5 x. Knoglemarv forøgedes ≈1,5 x på dag 5, men var ikke forskellig fra kontrolgrupperne på dag 8. I milten iagttoges en cellularitetsforøgelse på 1,5-1,8 x på dag 5 og 8 i højdosisgruppen. Thymuscellularitet var uændret på dag 5, men forøget 2 x på dag 8 i højdosisgruppen.

Eksempel 10

Fremstilling af med IL-7 immunreaktive antistoffer

Præparater af oprenset nativt eller rekombinant IL-7, fx. human

IL-7, anvendes til dannelse af polyklonale antisera eller fortrinsvis monoklonale antistoffer mod IL-7 under anvendelse af konventionelle teknikker, fx. som beskrevet i US-patentskrift nr. 4.411.993. Sådanne antistoffer er sandsynligvis anvendelige til påvisning af IL-7 eller til neutralisering af biologisk IL-7 aktivitet i assays eller forsøg, der involverer multiple lymfokiner.

Til immunisering af mus emulgeres et i det væsentlige rent IL-7 præparat i komplet Freund's adjuvans og injiceres i mængder i området fra 10 til 100 µg subkutant i Balb/c-mus. 10 til 12 dage senere boostes de immuniserede mus med yderligere IL-7 emulgeret i ukomplet Freund's adjuvans og boostes herefter periodevis efter et ugentligt eller 2-ugentligt immuniseringsskema. Serumprøver udtages periodisk ved retroorbital udtagning eller halespidseexcision for testning ved dot-blot assay (antistof-sandwich) eller ELISA (enzymbundet immunsorbentassay). Andre assay-procedurer er også egnede. Efter påvisning af en passende antistoftiter gives positive dyr en intravenøs injektion af antigen i saltvand. 3 til 4 dage senere aflives dyrene, splenocytter høstes og fusioneres med den murine myelomacellelinie NS1. Ved denne fremgangsmåde dannede hybridomacellelinier udplades på multiple mikrotiterplader i et HAT-selektivt medium (hypoxanthin, aminopterin og thymidin) til inhibering af proliferation af ikke-fusionerede celler, myelomahybrider og miltcellehybrider.

Således dannede hybridomakloner kan screenes ved ELISA for reaktivitet med IL-7, fx. ved tillempninger af de af Engvall et al., Immunochemistry 8:871 (1971) og i US-patentskrift nr. 4.703.004 beskrevne teknikker. Positive kloner injiceres så i de peritoneale kaviteter på syngeniske Balb/c-mus til fremstilling af ascites indeholdende høje koncentrationer (>1 mg/ml) af monoklonalt anti-IL-7-antistof. Det resulterende monoklonale antistof kan oprenses ved ammoniumsulfatpræcipitation efterfulgt af gelekskusionskromatografi og/eller affinitetskromatografi baseret på binding af antistof til protein A i Staphylococcus aureus.

PATENTKRAV

1. En DNA-sekvens, der indkoder en biologisk aktiv mammal Interleukin-7 (IL-7), IL-7-analog eller -underenhed, hvilken DNA-sekvens omfatter:

- (a) nukleotidsekvensen fra Figur 3 eller 5;
- (b) en sekvens, som under moderat stringente forhold hybridiseres til, eller som er substantielt homolog med, sekvensen i (a); eller
- (c) en sekvens, som er degenereret som et resultat af den genetiske kode, til en sekvens i (a) eller (b);

hvori IL-7-analogen eller -underenheden udviser biologisk aktivitet som naturligt forekommende IL-7.

2. DNA-sekvens ifølge krav 1, kendetegnet ved, at den i det væsentlige består af et syntetisk gen, der indkoder en mammal IL-7, IL-7-analog eller -underenhed, som kan udtrykkes i en rekombinant transkriptionel enhed omfattende inducerbare regulatoriske elementer stammende fra en mammal, mikrobiel eller viral operon.

3. DNA-sekvens ifølge krav 1 eller 2, kendetegnet ved, at den er mere end 90% identisk med nukleotidsekvensen, der indkoder murin IL-7, vist i Figur 3.

4. DNA-sekvens ifølge krav 1 eller 2, kendetegnet ved, at den er mere end 90% identisk med nukleotidsekvensen, der indkoder human IL-7, vist i Figur 5.

5. DNA-sekvens ifølge krav 1 eller 2, kendetegnet ved, at den omfatter nukleotidsekvensen:

- (i) fra -75 til 387 fra Figur 3;
- (ii) fra 1 til 387 fra Figur 3:
- (iii) fra -75 til 456 fra Figur 5; eller
- (iv) fra 1 til 456 fra Figur 5.

6. DNA-sekvens ifølge krav 1 eller 2, kendetegnet ved, at den indkoder human IL-7 (med N-terminal-sekvensen Asp-Cys-Asp-Ile-Glu-Gly-Lys-Asp-Gly-Lys-Gln-Tyr) eller murine IL-7 (having the N-terminal sequence Glu-Cys-His-Ile-Lys-Asp-Lys-Glu-Gly-Lys-Ala-Tyr).

7. Rekombinant ekspressionsvektor, kendetegnet ved, at den omfatter en DNA-sekvens ifølge et hvilket som helst af kravene 1-6.

8. Fremgangsmåde til fremstilling af en mammal IL-7, IL-7-analog eller -underenhed med biologisk aktivitet som naturligt forekommende IL-7, hvilken fremgangsmåde er kendetegnet ved, at man dyrker en egnet værtscelle omfattende en vektor ifølge krav 7 under betingelser, der fremmer ekspression af IL-7, IL-7-analogen eller -underenheden.

9. Et oprenset protein, der er murin eller human IL-7, IL-7-analog eller -underenhed med biologisk aktivitet som naturligt forekommende IL-7, som er indkodet af DNA ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, eller som er substantielt homolog med aminosyresekvensen fra Figur 3 eller 5.

10. Et protein ifølge krav 9, som har en aminosyresekvens, som er mere end 90% identisk med den humane IL-7-aminosyresekvens i resterne 1-152 vist i Figur 5.

11. Et protein ifølge krav 9, som har en aminosyresekvens, som er mere end 90% identisk med den humane IL-7-aminosyresekvens i resterne 1-129 vist i Figur 3.

12. Et protein ifølge krav 9 eller 10, som er en human IL-7-analog, hvor en eller flere cystein-rester er blevet erstattet med ikke-cysteine aminosyrer.

13. Et protein ifølge krav 9 eller 10, som er en human IL-7-analog, hvor en eller flere aminosyrer, som svarer til resterne 121-139 i det modne humane protein, er blevet slettet.

14. En proteinsammensætning omfattende et protein ifølge et hvilket som helst af kravene 9-13 fremstillet ved rekombinant cellekultur og med en specifik aktivitet på mindst 1 x 10^4 IL-7-enheder/µg ved den murine præ-B-celleproliferationsassay.

15. Et protein som defineret i et hvilket som helst af kravene 9-11 til anvendelse i human eller veterinær medicin.

16. Anvendelse af et protein som defineret i et hvilket som helst af kravene 9-11 til fremstilling af et lægemiddel til stimulering af B- eller T-lymfocytudvikling og -formering eller forøgelse af immunresponsen hos et pattedyr.

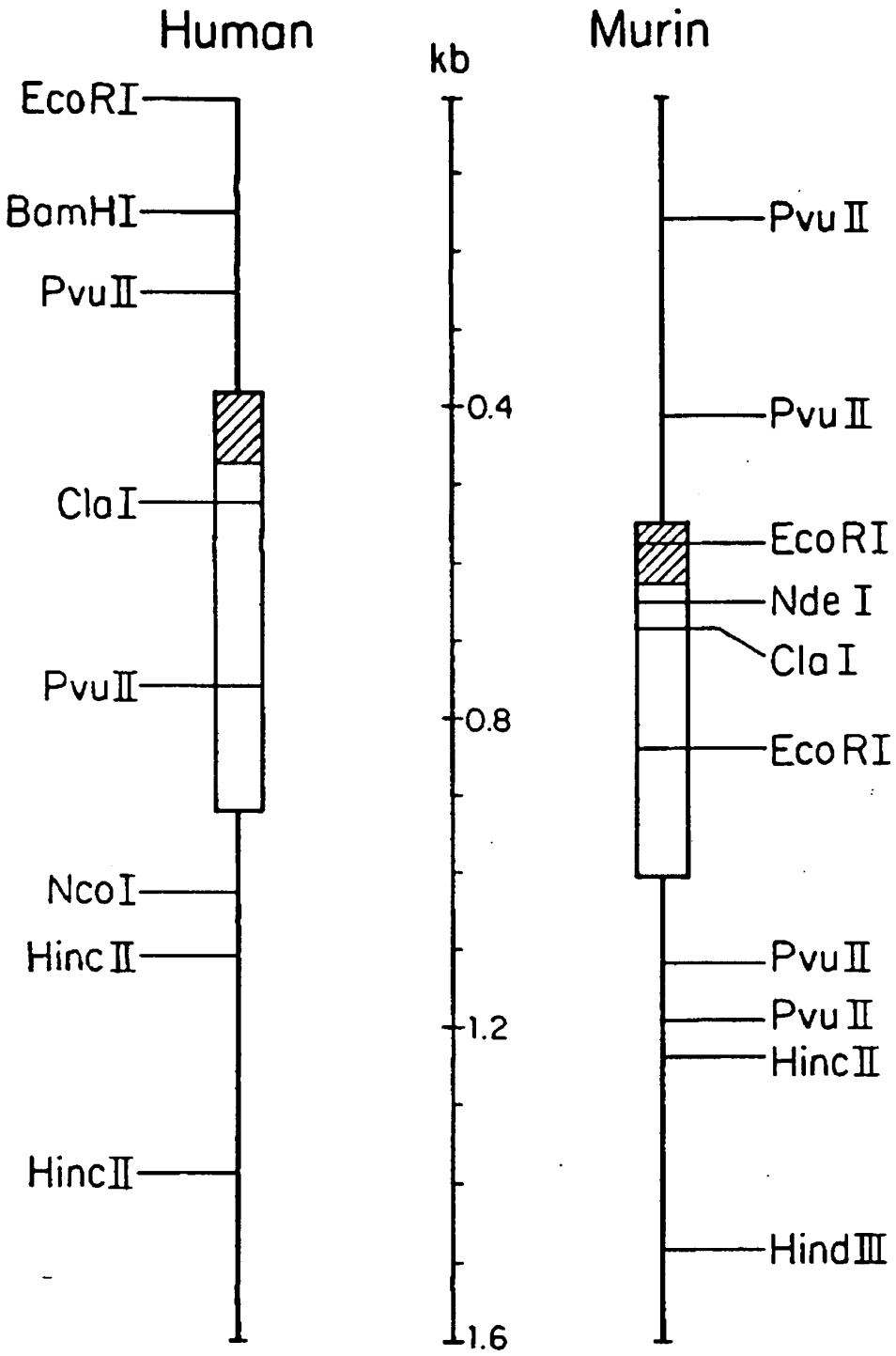
17. Anvendelse ifølge krav 15, kendetegnet ved, at proteinet er human IL-7, og det pattedyr, som skal behandles, er et menneske.

18. Farmaceutisk præparat, som er egnet til parenteral administrering til en menneskelig patient for profylaktisk eller terapeutisk stimulering af B- eller T-lymfocytudvikling og -proliferation eller forstærkning af immunrespons, kendetegnet ved, at det omfatter en virksom mængde af en human IL-7-protein som defineret i krav 9 eller 10 i blanding med en egnet diluent eller bærer.

19. Antistof, som er immunreaktivt med et protein som defineret i et hvilket som helst af kravene 9-11.

20 Antistof ifølge krav 19, kendetegnet ved, at antistoffet er monoklonalt.

21. Præparat til diagnose, analyse eller terapi, kendetegnet ved, at det omfatter et monoklonalt antistof, som er immunreaktivt med et protein som defineret i et hvilket som helst af kravene 9-11.


Human
kb
Murin
EcoRI
BamHI
PvuII
ClaI
PvuII
NcoI
HincII
HincII
0.4
0.8
1.2
1.6
PvuII
PvuII
EcoRI
NdeI
ClaI
EcoRI
PvuII
PvuII
HincII
HindIII

Figur 1

FIGUR 2: MURIN IL-7 cDNA -kodning:548-1012; moden:623-1012

```
   1  CTTGCAATAG CGAGCTTTCT CTGCTGCACA TTTGTGGCTT CTGTGGACAT
  51  ATTAGTAACC AGCGGTTTTA GCTCCCAGTC TCACAGAGTT GCCAGAGAGG
 101  TTAGAAGTCA TTTGAAAAGC CTATTAGCCG AATCTTTCTG ATCCAGAAGG
 151  CCAGCTGGCT TCTCCTGAGC TACTTTCAAT TCGCAGCAAC CACTGATCCT
 201  GGTCCAGGTG ACTGGGGAAG ACGCTGAGGG TATAAACCCA AACATTGAAC
 251  CTGAAGACCC AGCGCAAAGT AGAAACTGAA AGTACCCTGC TTACTCTGCC
 301  GGCAGATCCT ACGGAAGTTA TGGCAAAGCC AGAGCGCCTG GGTGGCCGGT
 351  GATGCATGCG GCCCCTCTTG GGATGGATGG ACCAGGCGTG GCGTGGGTGA
 401  GAGGAGTCAG CTGCCTGAAC TGCCCTGCCC AGCACCGGTT TGCGGCCACC
 451  CGGTGGATGA CCGGGGTCCT GGGAGTGATT ATGGGTGGTG AGAGCCGGCT
 501  CCTGCTGCAG TCCCAGTCAT CATGACTACA CCCACCTCCC GCAGACCATG
 551  TTCCATGTTT CTTTTAGATA TATCTTTGGA ATTCCTCCAC TGATCCTTGT
 601  TCTGCTGCCT GTCACATCAT CTGAGTGCCA CATTAAAGAC AAAGAAGGTA
 651  AAGCATATGA GAGTGTACTG ATGATCAGCA TCGATGAATT GGACAAAATG
 701  ACAGGAACTG ATAGTAATTG CCCGAATAAT GAACCAAACT TTTTTAGAAA
 751  ACATGTATGT GATGATACAA AGGAAGCTGC TTTTCTAAAT CGTGCTGCTC
 801  GCAAGTTGAA GCAATTTCTT AAAATGAATA TCAGTGAAGA ATTCAATGTC
 851  CACTTACTAA CAGTATCACA AGGCACACAA ACACTGGTGA ACTGCACAAG
 901  TAAGGAAGAA AAAAACGTAA AGGAACAGAA AAAGAATGAT GCATGTTTCC
 951  TAAAGAGACT ACTGAGAGAA ATAAAAACTT GTTGGAATAA AATTTTGAAG
1001  GGCAGTATAT AAACAGGACA TGTAGTAACA ACCTCCAAGA ATCTACTGGT
1051  TCATATACTT GGAGAGGTTG AAACCCTTCC AGAAGTTCCT GGATGCCTCC
1101  TGCTCAAATA AGCCAAGCAG CTGAGAAATC TACAGTGAGG TATGAGATGA
1151  TGGACACAGA AATGCAGCTG ACTGCTGCCG TCAGCATATA CATATAAAGA
1201  TATATCAACT ATACAGATTT TTGTAATGCA ATCATGTCAA CTGCAATGCT
1251  TTTAAAACCG TTCCAAATGT TTCTAACACT ACAAAGTCTA CAAAAAGCAA
1301  GGCTATGAAG ATTCAGAGTC ACCACTGTTT TCTTAGCAAA ATGATGGTAT
1351  GGTTAAACAT TCATTGGTGA ACCACTGGGG GAGTGGAACT GTCCTGTTTT
1401  AGACTGGAGA TACTGGAGGG CTCACGGTGA TGGATAATGC TCTTGAAAAC
1451  AAGAGTCTAT CTTAAAGCAG CAGCAAAAAG AAGCTTAAGG CACTTAAGGC
1501  AGCAACAAAT GTAGTTAAAT ATGAATGTAT AACACATAAC TTCAGTAAAG
1551  AGCATAGCAG ATATTTTTAA ATAAAAGTAT TTTTAAAGAT AAAAAAAAAA
1601  AAAAAA
```

FIGUR 3: Murin IL-7 kodningssekvens

```
ATG TTC CAT GTT TCT TTT AGA TAT ATC TTT GGA ATT CCT CCA CTG  -31
Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Ile Pro Pro Leu  -11

ATC CTT GTT CTG CTG CCT GTC ACA TCA TCT GAG TGC CAC ATT AAA   15
Ile Leu Val Leu Leu Pro Val Thr Ser Ser Glu Cys His Ile Lys    5

GAC AAA GAA GGT AAA GCA TAT GAG AGT GTA CTG ATG ATC AGC ATC   60
Asp Lys Glu Gly Lys Ala Tyr Glu Ser Val Leu Met Ile Ser Ile   20

GAT GAA TTG GAC AAA ATG ACA GGA ACT GAT AGT AAT TGC CCG AAT  105
Asp Glu Leu Asp Lys Met Thr Gly Thr Asp Ser Asn Cys Pro Asn   35

AAT GAA CCA AAC TTT TTT AGA AAA CAT GTA TGT GAT GAT ACA AAG  150
Asn Glu Pro Asn Phe Phe Arg Lys His Val Cys Asp Asp Thr Lys   50

GAA GCT GCT TTT CTA AAT CGT GCT GCT CGC AAG TTG AAG CAA TTT  195
Glu Ala Ala Phe Leu Asn Arg Ala Ala Arg Lys Leu Lys Gln Phe   65

CTT AAA ATG AAT ATC AGT GAA GAA TTC AAT GTC CAC TTA CTA ACA  240
Leu Lys Met Asn Ile Ser Glu Glu Phe Asn Val His Leu Leu Thr   80

GTA TCA CAA GGC ACA CAA ACA CTG GTG AAC TGC ACA AGT AAG GAA  285
Val Ser Gln Gly Thr Gln Thr Leu Val Asn Cys Thr Ser Lys Glu   95

GAA AAA AAC GTA AAG GAA CAG AAA AAG AAT GAT GCA TGT TTC CTA  330
Glu Lys Asn Val Lys Glu Gln Lys Lys Asn Asp Ala Cys Phe Leu  110

AAG AGA CTA CTG AGA GAA ATA AAA ACT TGT TGG AAT AAA ATT TTG  375
Lys Arg Leu Leu Arg Glu Ile Lys Thr Cys Trp Asn Lys Ile Leu  125

AAG GGC AGT ATA TAA                                         387
Lys Gly Ser Ile End                                         129
```

FIGUR 4: HUMAN IL-7 cDNA - kodning:385-915; moden :460-915

```
   1  GAATTCCTCT GGTCCTCATC CAGGTGCGCG GGAAGCAGGT GCCCAGGAGA
  51  GAGGGGATAA TGAAGATTCC ATGCTGATGA TCCCAAAGAT TGAACCTGCA
 101  GACCAAGCGC AAAGTAGAAA CTGAAAGTAC ACTGCTGGCG GATCCTACGG
 151  AAGTTATGGA AAAGGCAAAG CGCAGAGCCA CGCCGTAGTG TGTGCCGCCC
 201  CCCTTGGGAT GGATGAAACT GCAGTCGCGG CGTGGGTAAG AGGAACCAGC
 251  TGCAGAGATC ACCCTGCCCA ACACAGACTC GGCAACTCCG CGGAAGACCA
 301  GGGTCCTGGG AGTGACTATG GGCGGTGAGA GCTTGCTCCT GCTCCAGTTG
 351  CGGTCATCAT GACTACGCCC GCCTCCCGCA GACCATGTTC CATGTTTCTT
 401  TTAGGTATAT CTTTGGACTT CCTCCCCTGA TCCTTGTTCT GTTGCCAGTA
 451  GCATCATCTG ATTGTGATAT TGAAGGTAAA GATGGCAAAC AATATGAGAG
 501  TGTTCTAATG GTCAGCATCG ATCAATTATT GGACAGCATG AAAGAAATTG
 551  GTAGCAATTG CCTGAATAAT GAATTTAACT TTTTTAAAAG ACATATCTGT
 601  GATGCTAATA AGGAAGGTAT GTTTTTATTC CGTGCTGCTC GCAAGTTGAG
 651  GCAATTTCTT AAAATGAATA GCACTGGTGA TTTTGATCTC CACTTATTAA
 701  AAGTTTCAGA AGGCACAACA ATACTGTTGA ACTGCACTGG CCAGGTTAAA
 751  GGAAGAAAAC CAGCTGCCCT GGGTGAAGCC CAACCAACAA AGAGTTTGGA
 801  AGAAAATAAA TCTTTAAAGG AACAGAAAAA ACTGAATGAC TTGTGTTTCC
 851  TAAAGAGACT ATTACAAGAG ATAAAAACTT GTTGGAATAA AATTTTGATG
 901  GGCACTAAAG AACACTGAAA AATATGGAGT GGCAATATAG AAACACGAAC
 951  TTTAGCTGCA TCCTCCAAGA ATCTATCTGC TTATGCAGTT TTTCAGAGTG
1001  GAATGCTTCC TAGAAGTTAC TGAATGCACC ATGGTCAAAA CGGATTAGGG
1051  CATTTGAGAA ATGCATATTG TATTACTAGA AGATGAATAC AAACAATGGA
1101  AACTGAATGC TCCAGTCAAC AAACTATTTC TTATATATGT GAACATTTAT
1151  CAATCAGTAT AATTCTGTAC TGATTTTTGT AAGACAATCC ATGTAAGGTA
1201  TCAGTTGCAA TAATACTTCT CAAACCTGTT TAAATATTTC AAGACATTAA
1251  ATCTATGAAG TATATAATGG TTTCAAAGAT TCAAAATTGA CATTGCTTTA
1301  CTGTCAAAAT AATTTTATGG CTCACTATGA ATCTATTATA CTGTATTAAG
1351  AGTGAAAATT GTCTTCTTCT GTGCTGGAGA TGTTTTAGAG TTAACAATGA
1401  TATATGGATA ATGCCGGTGA GAATAAGAGA GTCATAAACC TTAAGTAAGC
1451  AACAGCATAA CAAGGTCCAA GATACCTAAA AGAGATTTCA AGAGATTTAA
1501  TTAATCATGA ATGTGTAACA CAGTGCCTTC AATAAATGGT ATAGCAAATG
1551  TTTTGACATG AAAAAAGGAC AATTTCAAAA AAAAAAAA
```

FIGURE 5: Human IL-7 kodningssekvens

```
ATG TTC CAT GTT TCT TTT AGG TAT ATC TTT GGA CTT CCT CCC CTG -31
Met Phe His Val Ser Phe Arg Tyr Ile Phe Gly Leu Pro Pro Leu -11

ATC CTT GTT CTG TTG CCA GTA GCA TCA TCT GAT TGT GAT ATT GAA  15
Ile Leu Val Leu Leu Pro Val Ala Ser Ser Asp Cys Asp Ile Glu   5

GGT AAA GAT GGC AAA CAA TAT GAG AGT GTT CTA ATG GTC AGC ATC  60
Gly Lys Asp Gly Lys Gln Tyr Glu Ser Val Leu Met Val Ser Ile  20

GAT CAA TTA TTG GAC AGC ATG AAA GAA ATT GGT AGC AAT TGC CTG 105
Asp Gln Leu Leu Asp Ser Met Lys Glu Ile Gly Ser Asn Cys Leu  35

AAT AAT GAA TTT AAC TTT TTT AAA AGA CAT ATC TGT GAT GCT AAT 150
Asn Asn Glu Phe Asn Phe Phe Lys Arg His Ile Cys Asp Ala Asn  50

AAG GAA GGT ATG TTT TTA TTC CGT GCT GCT CGC AAG TTG AGG CAA 195
Lys Glu Gly Met Phe Leu Phe Arg Ala Ala Arg Lys Leu Arg Gln  65

TTT CTT AAA ATG AAT AGC ACT GGT GAT TTT GAT CTC CAC TTA TTA 240
Phe Leu Lys Met Asn Ser Thr Gly Asp Phe Asp Leu His Leu Leu  80

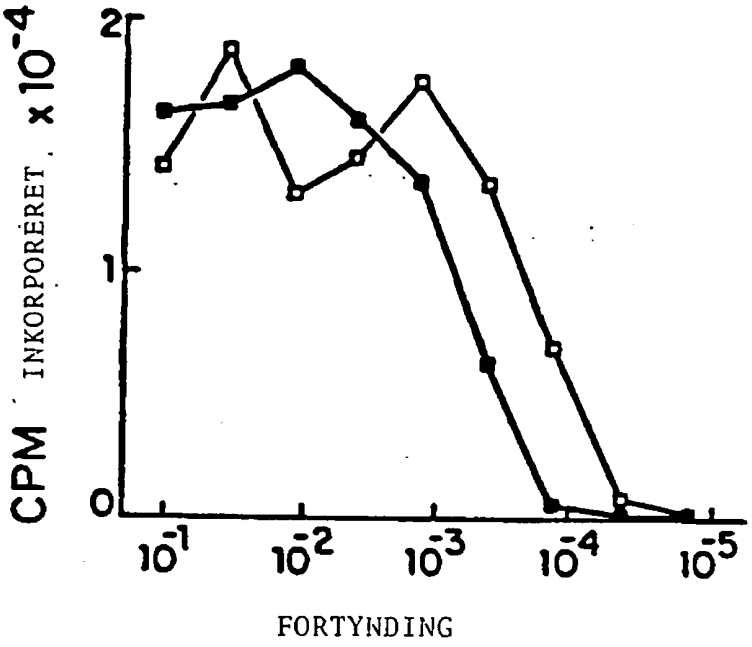
AAA GTT TCA GAA GGC ACA ACA ATA CTG TTG AAC TGC ACT GGC CAG 285
Lys Val Ser Glu Gly Thr Thr Ile Leu Leu Asn Cys Thr Gly Gln  95

GTT AAA GGA AGA AAA CCA GCT GCC CTG GGT GAA GCC CAA CCA ACA 330
Val Lys Gly Arg Lys Pro Ala Ala Leu Gly Glu Ala Gln Pro Thr 110

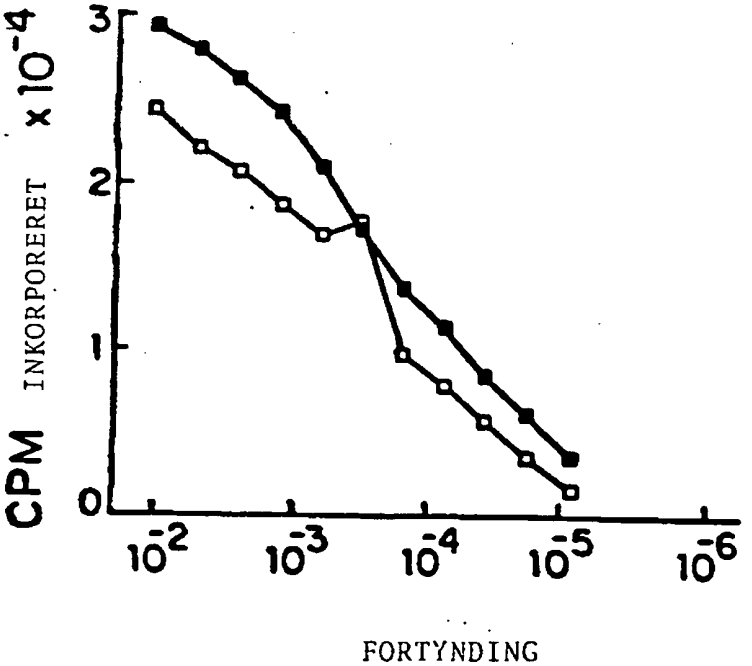
AAG AGT TTG GAA GAA AAT AAA TCT TTA AAG GAA CAG AAA AAA CTG 375
Lys Ser Leu Glu Glu Asn Lys Ser Leu Lys Glu Gln Lys Lys Leu 125

AAT GAC TTG TGT TTC CTA AAG AGA CTA TTA CAA GAG ATA AAA ACT 420
Asn Asp Leu Cys Phe Leu Lys Arg Leu Leu Gln Glu Ile Lys Thr 140

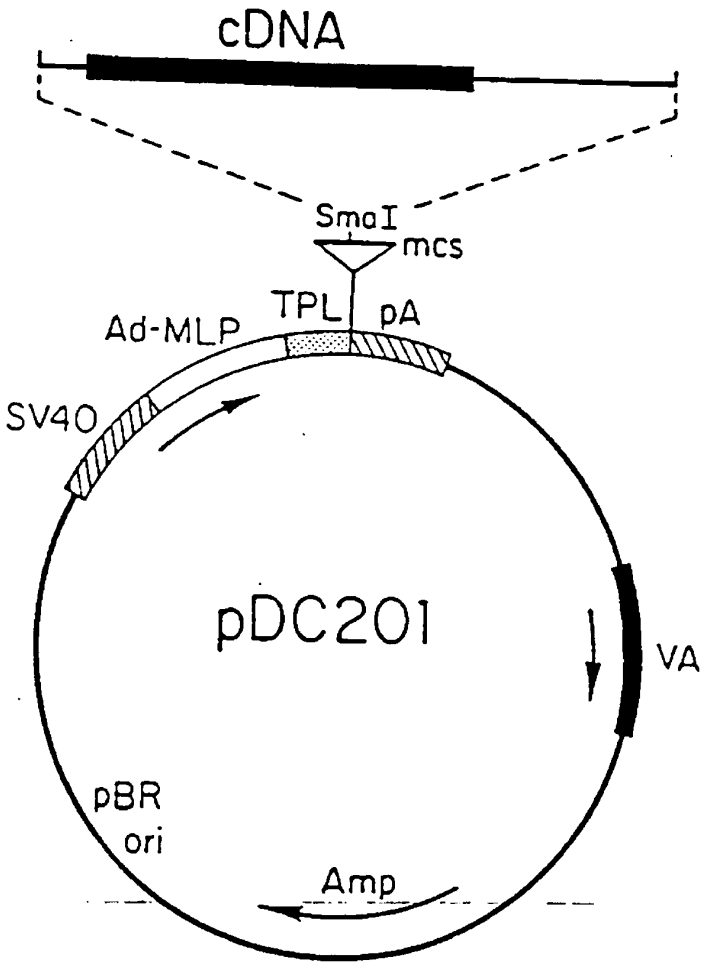
TGT TGG AAT AAA ATT TTG ATG GGC ACT AAA GAA CAC TGA         456
Cys Trp Asn Lys Ile Leu Met Gly Thr Lys Glu His End         152
```



FIGUR 6A



FIGUR 6B



FIGUR 7