

2850/90

1 2 3 4 5 6 7 8 9 0 / 9 0

- 5 6 1 3 4 -

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

52.792/BE

K I V O N A T

Eljárás rekombináns humán interleukin-3 és muteinjai előállítására és tisztítására

Gist-Brocades N.V., Delft, Hollandia

A bejelentés napja: 1990. 03. 15.

Elsőbbségei: 1989. 03. 15. (89200660.2) Európa

1989. 07. 25. (89201967.0) Európa

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/NL90/00030

A nemzetközi közzététel száma: WO 90/110705

Rekombináns technológiával előállított IL-3-at tisztítanak több lépésben, amikor is először a hidrofób kölcsönhatást, majd ezt követően az ioncserélő kromatografálást és a géliszűrést alkalmazzák. Ezenkívül eljárásokat ismertetnek a rekombináns hIL-3 glükozilált formájának emlős és élesztő sejtekből való előállítására vagy nem glükozilált formájának prokariótákból való előállítására.

Földvár

2850/90

1990/90

-56134-

**KÖZZÉTÉTELI  
PÉLDÁNY**

Képv: BN ű MK

"A"

52.792/BE

NR05 C12N15/24

A6IK39/02

C07K3/28

Eljárás rekombináns humán interleukin-3 és muteinjei  
előállítására és tisztítására

Gist-Brocades N.V., Delft, Hollandia

Feltalálók: PERSON, Nicolaas Ludovicus Maria, Leiden,

VAN LEEN Robert Willem, Nieuwerkerk a/d Ijssel,

Hollandia

A bejelentés napja: 1990. 03. 15.

Elsőbbségei: 1989. 03. 15. (89200660.2) Europa

1989. 07. 25. (89201967.0) Europa

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/NL90/00030

A nemzetközi közzététel száma: **WO 90/10705**

A találmány humán interleukin-3 (hIL-3) és muteinjei  
előállítására vonatkozik. Részletesebben, termelésüket úgy  
valósítjuk meg, hogy az ilyen vegyületeket kódoló klónozott  
DNS-t vektor/gazda rendszerek széles változatában fejezzük ki.

Ihle és munkatársai egy javított tisztítási eljárást is bemutatnak. [J.Immunol., 129, 2431-2436 (1982)] WEHI-3 sejteket használva, amelyek konstitutive termelték az egér IL-3-at (mIL-3). Itt a korábbi eljárást egészítették ki hidroxil-apatit és reverz-fázisú nagyteljesítményű folyadék kromatográfiával (HPLC = high performance liquid chromatography), s így a végterméket 1,800.000-szeres tisztasággal tudták előállítani (a szerzők I. táblázata). A termékről azt állították, hogy homogén.

Miyajima és munkatársai [Gene, 58, 273-281 (1987)] Bombyx mori selyemhernyót és egy rovar baculovirus vektort használtak az egér IL-3 magas szintű expressziójára és szekretálására. A mIL-3 tisztítását a szövet-tenyésztő tápoldatból DEAE-Sephadex, ACA 54 és C8 reverz fázisú oszlopkromatográfia egymás után való alkalmazásával végezték el. A három mIL-3 fajta (18, 20 és 22 kDa) elválasztásához egy második C8 reverz fázisú oszlopra volt szükség. A különböző fajták a különböző glükozilációs foknak felelnek meg, ugyanis az N-glükánázzal való kezelés egyetlen végső 15 kD sávot eredményezett.

Ziltener és munkatársai [J.Biol.Chem., 263, 14511-14517 (1988)] az IL-3 sokféleképpen glükozilált formáinak affinitás tisztítással való izolálását írták le. A megfigyelt mikroheterogenitás az eredettől (aktivált T sejtek, WEHI-3B sejtek vagy COS 7 sejtek) függött.

A fenti eljárások mindegyikében az egér IL-3 tisztítását írták le a szerzők. Az egér és humán IL-3 megfigyelt hasonlósága ellenére, ami a hematopoetikus progenitor sejtekre való proliferatív hatásukat illeti, a két protein közötti szerkezeti homológia meglehetősen alacsony (aminosav szinten 28 %). A szerkezeti különbözőség specificitásbeli különbözőséghez vezet, amit az mutat, hogy a humán proteineknek semmilyen hatása nincs az egér sejtekre és megfordítva. Specifikus aminosav összetételük alapján a két protein különböző tisztítási módszereket igényel.

A gibbon és a humán IL-3 — amelyeknél a szerkezeti homológia 93 %-os (aminosav szinten) — tisztításával számos szabadalmi leírás foglalkozik. A WO 88/00598 számú nemzetközi szabadalmi leírás tárgya egy részben szintetikus hIL-3, amelyet E.coli zárvényaiból (szemcséiből) izoláltak. A sejteket French press készülékben, két menetben először elroncsolták, majd a szemcséket szacharóz grádiens centrifugálással izolálták. Ez a dokumentum három eljárást is leír egy humán vagy gibbon IL-3 szerű polipeptid tisztítására COS sejtekkel kondicionált táptalajból. Mindegyik esetben egy-oszlopos eljárást használtak: vagy ioncserélő oszlopot vagy egy lentil lektin oszlopot vagy reverz fázisú HPLC-t. A gibbon IL-3-ra kapott maximális tisztaság — automata Edman degradációval meghatározva — 98 %-os volt. Ez azonban egyáltalán nem olyan technika, amivel a proteinek tisztasága pontosan meghatározható.

A WO 88/05469 számú nemzetközi szabadalmi leírás humán IL-3 tisztítását ismerteti élesztő törzsekből egyetlen vagy egymást követő reverz fázisú HPLC lépésekkel. Az alkalmazott HPLC menetek számát nem határozta meg a leírás, de említette, hogy ha szükséges, úgy további lépések használhatók. A hIL-3 végső tisztaságának meghatározására semmilyen vizsgálatot nem tartalmaz a szabadalmi leírás, s ebből világosan következtethető, hogy nem kaptak homogén terméket.

Arra a következtetésre juthatunk, hogy eddig nem adtak közre specifikus módszereket a hIL-3 és a hasonló aktivitású vegyületek tisztítására. Ennélfogva még mindig szükség van olyan, lényegében tiszta hIL-3-ra, amely terápiás célra használható, és olyan eljárásra, amellyel egy ilyen lényegében tiszta termék nagy kitermeléssel állítható elő. Előnyös, ha az eljárás könnyen adaptálható nagyobb méretekre.

A humán IL-3 klónozásáról és expressziójáról az alábbi közlemények jelentek meg.

Yang és munkatársai [Cell, 47, 3-10 (1986)] azonosítottak egy hIL-3-at kódoló gént úgy, hogy szondaként egy gibbon IL-3-at kódoló cDNS-t használtak, és leírták a humán gén exonjainak a szekvenciáját.

A WO 88/00598 számú nemzetközi szabadalmi leírás ismerteti, hogy ez a humán gén eukarióta sejtekben, amelyekben az RNS összeillesztődik, átíródik. Az RNS izolálása után előállítják a cDNS-t, és a hIL-3 cDNS-t gibbon IL-3 cDNS-sel való hibridizálással azonosítják.

Dorssers és munkatársai [Gene, 55, 115-124 (1987)] egér IL-3 cDNS-sel való hibridizálás segítségével izoláltak egy hIL-3-at kódoló cDNS-t. A WO 88/04691 számú nemzetközi szabadalmi leírás kiemeli, hogy ez a hibridizáció feltehetően a humán és az egér IL-3 gén 3' nem-kódoló szakaszai közt meglévő váratlanul magas fokú homológiának köszönhető. A cDNS klónozása után az IL-3-at egymás után, számos gazdasejtben, így E.coliban, Bacillusokban, élesztőkben és szövettenyészetekben is kifejezték. Általában az expressziós termékek biológiailag aktívak voltak. Ez a szabadalmi bejelentés az első, amely leírja a Pro jelenlétét az érett protein 8-as pozíciójában.

A WO 88/05469 sz. nemzetközi szabadalmi leírás egy hIL-3 kódoló cDNS izolálását írja le, szondaként egy olyan szintetikus DNS-t használva, amely a Yang és munkatársai (lásd az idézett közleményt) által leírt genomiális szekvenciából származik. A kapott cDNS szekvenciából azonban hiányzik két aminosav információja (a 44. és 45. vagy a 45. és 46., amelyek tetszőlegesen, mivel a határoló aminosav - akár deléció révén - egy Asp kódoló GAC). Egy transzformált élesztő sejt esetében, amely az említett cDNS szekvenciát egy expressziós kazettán belül tartalmazta, és amely egy 8 aminosavból álló N-terminális "ág"-hoz fuzionált érett hIL-3-at kódolt, ugyancsak megállapították, hogy tenyészetének felülúszója IL-3 aktivitást fejt ki humán csontvelő proliferációs vizsgálatban.

A WO 86/06161 számú nemzetközi szabadalmi leírás egy hIL-3 cDNS szekvencia izolálási eljárást ismerttet, szondaként

a Yang és munkatársai (lásd fentebb) által leírt genomiális szekvencia eredetű szintetikus DNS használatával. Ugyancsak leírtak egy teljesen szintetikus hIL-3-at kódoló szekvenciát és két mutein — Ile<sup>2</sup> és Leu<sup>131</sup> — szerkesztését ismertették. Biológiai aktivitásukat nem említették. Ezenkívül nyilvánvalóan feltételezték, hogy a hIL-3 132 aminosavat tartalmaz, amelyben az N-terminusz Pro<sup>1</sup>Met<sup>2</sup>-vel kezdődik, ugyanakkor általában az az elfogadott, hogy a hIL-3 133 aminosav hosszú és N-terminuszán Ala<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Met<sup>3</sup>-található.

Megjegyzendő, hogy Yang és munkatársai szerint egy Ser csoport van az érett hIL-3 8-as pozíciójában, míg minden más közlemény egy Pro jelenlétét jelzi ebben a pozícióban.

Az EP-A-285429 számú európai szabadalmi bejelentés egy olyan sejtvonal izolálását tartalmazza, amely egy hízó sejt növekedési faktor aktivitású faktort termel; és amelyet pontosan IL-3-nak nevez. Az az elfogadott, hogy a hIL-3-nak nincs proliferatív hatása egér csontvelő sejtekre, ugyanakkor az ebben a közlésben leírt, biokémiailag nem jellemzett faktor képes az ilyen sejtek stimulálására hízó sejtek kialakulását előidézve. Így tehát ez a faktor nem lehet azonos a hIL-3-al.

Hogy jobban megismerhessük a hIL-3 termelésére használt egyik expressziós vektor rendszert, a bovin papillomavírusra vonatkozó előzményekről az alábbi információk közlése lényeges.

A BPV-1 a legalább hat bovin papillomavírus egyike, és szarvasmarháknál a kután fibropapillomákkal van összefüggésben. Ezek a vírusok könnyen transzformálják a legkülönbözőbb rágcsőáló sejteket, ezek tenyészetében. A molekuláris klónozású bovin papillomavírus DNS, valamint egy klónozott 69 %-os szubgenomiális fragmentuma nagyon hatásosak transzformált helyek indukálása tekintetében. A transzformált sejtek a vírus DNS sok másolatát (sejtenként 10-120) tartalmazzák nem integrált (be nem épült) molekulákként [Law és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 2727-2731 (1981)]. Az I típusú bovin papillomavírus genetikáját részletesen tanulmányozták [összefoglalták Lambert és munkatársai, Ann. Rev. Genet., 22, 235-258 (1988)]. A BPV-1 genom egy cirkuláris, 7946 bázispárból álló kétszálú DNS molekula. Transzkripciója a sok promoter, összerillesztési hely jelenléte és az RNS fajták különböző képzése következtében bonyolult. Néhány promoter a transzkripció enhancerek (fokozók) szoros ellenőrzése alatt áll.

A BPV-1-et vagy 69 %-os szubgenomiális fragmentumát (BamHI-HindIII) széles körben használják különböző klónozási rendszerekben számos gén expressziós klónozására. Az EP-A-198386 számú európai szabadalmi bejelentés a gamma-interferon C127 egér sejtekben való expresszióját ismerteti. Az EP-A-105141 számú európai szabadalmi bejelentés a BPV vektor használatát írja le hepatitis B felületi antigén (HBsAg) expressziójára gerinces sejtvonalakban, ilyenek például a NIH 3T3, LTK egér fibroblaszt és afrikai zöld majom vese sejtek. A BPV-1-nek

klónozó hordozó részeként való felhasználása szerepel a 4,419,446 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi leírásban.

A jelen szabadalom — egyik szempontja szerint — a humán IL-3 rekombináns technikával való előállítására vonatkozik, amelyet homogenitásig tisztítunk.

A szabadalom a humán IL-3 homogenitásig való tisztítására eljárást ismertet, amelynek kezdő lépése egy hidrofób kölcsönhatás, ezt követi az ioncserélő kromatográfia és tetszés szerint a gélszűrés. Ez az eljárás különösen az olyan hIL-3 esetén előnyös, amelyet rekombináns prokarióta és eukarióta expressziós rendszerekben állítunk elő. Ezeket és még más szempontokat is ismertetünk a következő részletes leírásban.

A találmány a továbbiakban olyan expressziós rendszereket ismertet, amelyek a gazdasejtek és vektorok speciális kombinációiból állnak a humán IL-3-nak akár glükozilált formában emlős és élesztő sejtekből, akár nem glükozilált formában prokariótákból való előállítására. Ezek a rendszerek eredményesen használhatók IL-3 termelésére, amelyet ezután a találmány szerinti tisztítási eljárásoknak vetünk alá.

A találmány tárgyát képezik a bovin papillomavíruson alapuló vektorok és az ezen vektorokat tartalmazó sejtvonalak is. Az említett vektorokat olyan módon mutáljuk, hogy a klónozott gén által kódolt mRNS mennyisége nagyon megnövekedjék. Ezt előnyösen az E2-ORF (E=early, ORF= open reading frame) ATG start kodonjának a mutációjával érjük el.

Az alábbiakban az ábrák rövid leírása következik.

Az 1. ábra a hIL-3 expressziós kazettájának — amelyet a *B.licheniformis*-ben használunk — aminosav szekvenciáját és nukleotid szekvenciáját mutatja be. A nyíllal az érett protein start pontját jelezzük.

A 2. ábrán a *Bacillus licheniformis* T9 eredetű hIL-3-nak Fractogel TSK-butil 6500 (dxh = 25x8 cm) használatával végzett hidrofób kölcsönhatás kromatográfiával kapott eluciós profilja látható. A hIL-3-at tartalmazó frakciókat vízszintes vonallal jelezzük.

A 3. ábra a *Bacillus licheniformis* T9-ből származó hIL-3 Q-Sepharose Fast Flow (dxh = 10x11 cm) oszlopon végzett (első) anioncserélő kromatografálásával kapott eluciós profilját mutatja be.

A 4. ábra a *Bacillus licheniformis* T9-ből származó hIL-3 Q-Sepharose Fast Flow (dxh = 5x90 cm) oszlopon végzett (második) anioncserélő kromatografálásával kapott eluciós profilját mutatja be.

Az 5. ábra a *Bacillus licheniformis* T9-ből származó hIL-3 Sephacryl S100 HR (dxh = 5x90 cm) oszlopon végzett gél-szűrési kromatográfiával kapott eluciós profilját ábrázolja.

A 6. ábra csimpánz vérben a leukociták és trombociták számát mutatja 0-6 nap folyamán 30  $\mu$ g/kg IL-3 szubkután injekciója után.

Ebben a leírásban a "humán interleukin-3" és az ennek megfelelő "humán IL-3" vagy "hIL-3" kifejezéseket úgy a humán interleukin-3, mint minden olyan protein megjelölésére használjuk, amelyek humán IL-3-szerű hatást fejtenek ki. Széles értelemben az "IL-3" a főemlős IL-3 megjelölésére szolgál. Bár ez a leírás speciálisan a humán IL-3-ra irányul, magától értetődik a szakemberek számára, hogy a főemlős IL-3, amelynek magas fokú a homológiája a humán IL-3-al, ugyanezen eljárás szerint tisztítható. Előnyös, ha a homológia legalább 70 %-os aminosav szinten, még előnyösebb, ha ez legalább 90 %-os. Például a Rhesus majom (*Macaca mulatta*) eredetű érett IL-3 80,5 %-ban azonos - aminosav szinten - a humán IL-3 szekvenciával.

A többi természetben előforduló IL-3 variáns szintén alkalmas a találmány által ismertetett tisztítási eljárásra. A nem természetes mutánsok ugyancsak tisztíthatók, ha azonosságuk nem túl alacsony szintű (például 70 %). A nem természetes mutánsok olyan mutagenizált proteinek, amelyek megtartották IL-3 aktivitásukat. A mutációk magukba foglalják az addíciókat, deléciókat és szubsztitúciókat. Az ilyen többé-kevésbé kézenfekvő módon módosított proteinek ugyancsak ide tartoznak.

Az hogy egy protein "rekombináns", azt jelenti, hogy olyan mikroorganizmusok vagy sejt tenyészetek termelték, amelyek normál körülmények között nem termelik ezt a proteint vagy legalábbis nem termelik olyan mennyiségben, amely ipari termelésre alkalmazható. A mikroorganizmusok magukba foglalják a baktériumokat, élesztőket és gombákat. Ezenkívül szöveti

sejt-tenyészetek is használhatók, amelyek különösen fontosak, ha megfelelő glükózilációs fokra van szükség.

A találmány hatékony eljárást ismertet a rekombináns humán IL-3 homogenitásig való tisztítására. Az eljárás olyan lépések sorozatából áll, mint a hidrofób kölcsönhatás, ioncserélő kromatográfia és gélszűrés. Az említett módszerek speciális kombinációja meglepően rendkívül hatásosnak bizonyult lényegében tiszta hIL-3 előállítására. Ezenfelül ez a tisztítási módszer pirogénmentes terméket eredményez. Az eljárás nagyon alkalmas arra, hogy nagyobb méretekre alkalmazzák, s ez hatalmas előnyt jelent, mivel a sejtek által kiválasztott hIL-3-at tartalmazó fermentlé nagy mennyiségeit kell a tenyésztet szennyező komponensektől megtisztítani. A módszer különösen jól használható mind prokarióta, mind eukarióta transzformált sejtek által termelt hIL-3 tisztítására. Elvileg a fenti tisztítási módszerek tetszőleges sorrendben alkalmazhatók. Minden említett módszer önmaga is már jelentős tisztítást eredményez. Azonban a feltalálók azok, akik az alább leírt specifikus kombinációt elsőként mutatják be.

Előnyös, ha a kezdő tisztítási lépés a hidrofób kölcsönhatás. Ez a lépés nem szokványos és ennél fogva meglepő, hogy nagyon hatékonyan bizonyult a találmány célja szempontjából. Valószínű, hogy ez a lépés magának a proteinek a szerkezete alapján éri el a szelektív elválasztást. Ez a lépés a szennyezéseket - ilyenek az egyéb proteinek, a tápoldat komponensei és a színe - lényegében eltávolítja.

Második lépésként az ioncserélő kromatográfia alkalmazása az előnyös. Az átfolyt frakciókba kerül a hIL-3, elválasztva a legtöbb szennyező proteintól. Ez a lépés a maradék szint is eltávolítja. Ezenkívül, ha anion-cserélő kromatográfiát alkalmazunk, a DNS és az endotoxin mennyisége is jelentősen csökken.

Ha a tisztítandó kiindulási anyagban hIL-3 degradációs termékek is jelen vannak, például a Bacillus licheniformisból, ezeket a proteineket a nativ hIL-3-tól egy második anioncserélő kromatografálással eredményesen választhatjuk el. A kívánt eredményt előnyösen Q-Sepharose Fast Flow használatával érhetjük el. A hIL-3 degradációs termékek elválasztására szolgáló egyéb hatékony technikák közé tartozik például a hidroxil-apatiton való kromatografálás és a kromatofókuszálás pBE94 használatával.

Végső tisztítási lépésként eredményesen használhatjuk a gélszűrést. Ebben az eljárásban az alacsony molekulatömegű proteineket vagy aggregációs termékeket választjuk el az érett IL-3-tól.

A hidrofób kölcsönhatás előnyösen TSK-butil vagy oktil Sepharose oszlopon valósítható meg, amelyről a hIL-3 például vagy trisz.HCl-ben oldott ammónium-szulfáttal vagy etilén-glikollal eluálható.

A szennyező proteineknek (és más anyagoknak) ioncserélő kromatográfiával való eltávolításához például a következő

oszlopok szükségesek: TSK-DEAE, Q-Sepharose Fast Flow vagy TSK-CM.

Végül a gélszűréshez előnyösen használható a Biogel A vagy a Sephacryl S100 HR, amelyek a nem glükozilált hIL-3 tisztításának kiváló végső lépését jelentik.

A tisztítást akár az intracelluláris hIL-3-mal, akár a fermentlében lévő hIL-3-mal kezdhetjük el.

Az intracelluláris hIL-3 tisztítását (a hIL-3-nak E.coliban való expressziója után, amint itt ismertetjük) sokkal könnyebben végezhetjük el, ha a proteint az ún. zárvány-testek (szemcsék) tartalmazzák. Ekkor az első lépés e zárványok izolálása, amelyek a terméket viszonylag tiszta formában és nagy koncentrációban tartalmazzák. Szolubilizálásuk után a hIL-3 a továbbiakban kromatográfiával tisztítható.

Ha a hIL-3-at fermentlé tartalmazza (például B.licheniformis, élesztő, illetve eukarióta sejt tenyészetek használata esetén, amint ezt majd ismertetjük), a tisztítás a sejtmentes tápoldat készítésével kezdődik.

Annak érdekében, hogy az eljárásnak a rekombináns technológiával kapott hIL-3 tisztítására való általános felhasználhatóságát bemutassuk, számos expressziós vektort készítettünk. Ezek a vektorok azon vektorok széles változatát példázzák, amelyeket a hIL-3 expressziójára használhatunk baktériumokban, gombákban, élesztőkben és más eukarióta sejtekben. Ezeknek az

expressziós vektoroknak a szerkeztését az alábbiakban általános szempontok szerint ismertetjük.

A WO 88/04611 sz. nemzetközi szabadalmi leírás — melyre itt referenciaként hivatkozunk — számos eljárást ismertet a hIL-3 előállítására. A jelen találmány szerinti heterológ gén expresszió által megvalósított termelést a következő kombinációkra alapozzuk: egyrészt a gazdasejt szignál szekvenciáinak az érett hIL-3 kódoló szekvenciáival — a Bacillus erős promotereivel együtt — való tökéletes fúziójára, másrészt az erős prometer/enhancer kombinációkra és a BPV-1 eredetű vektoroknál a mRNS stabilizáló szekvenciákra a C127, FR3T3 vagy CHO sejtekben.

A WO 88/04691 számú nemzetközi szabadalmi leírás a hIL-3 expressziójának Bacillus fajokban használt minden elemét tartalmazza. Azonban úgy találtuk, hogy a promoterek, szignál szekvenciák és az érett hIL-3 szekvenciák optimális kombinációja a különböző genetikai elemek átcsoportosítása révén érhető el. Megálbították, hogy Bacillus fajban a hIL-3 megfelelő szekréciónálhoz döntő fontosságú, hogy az  $\alpha$ -amiláz szignál szekvencia és a hIL-3 kódoló szekvencia között tökéletes legyen a kapcsolat. A  $\sigma^{43}$  prometer használatakor (lásd a 88/04691 számú nemzetközi szabadalmi leírást) a hIL-3 már megjelenik a táptalajban, de csak akkor kaptak magas szintű expressziót, ha az erős  $\alpha$ -amiláz vagy HpaII promotert bevezették az expressziós plazmidba.

A WO 88/04691 számú nemzetközi szabadalmi leírás ugyan-  
csak közli, hogy a C127 sejtek aktiv hIL-3-at fejeznek ki.  
Azonban az expressziós szintek viszonylag alacsonyak a pLB4/BPV  
vektor használatával. A Moloney egér szarkómavírus (MSV=murane  
sarcoma vírus) enhancer és az egér metallothionein I promoter  
kombinációja vagy a humán citomegalovírus enhancer/promoter  
használat a pLB4/BPV-ben lévő SV40 enhancer/promoter helyett,  
a hIL-3 magas expressziós szintjeit eredményezi emlős sejtekben.

A hIL-3 cDNS szekvencia helyettesítése a genomiális hIL-3  
szekvenciával jótékony hatással van a hIL-3 mRNA állandó szint-  
jére és a hIL-3 termelésre emlős sejtekben.

Az mRNA szint további növelése érhető el BPV-t tartalmazó  
vektorok használatával. A leírásban említjük, hogy a BPV-1 ge-  
nom egy cirkuláris, 7946 bázispárt tartalmazó kétszálú DNS mo-  
lekula. A transzkripciója bonyolult a sok promoter, illesztési  
hely (splice sites) jelenléte és az RNS fajták termelésének  
különbélete miatt. Bizonyos promoterek tevékenysége a transz-  
kripció enhancerek szigorú szabályozása alatt áll. Az un.  
E2-ORF nagyon fontos ebből a szempontból. A teljes hosszúságú  
E2 ORF egy olyan transzaktiváló proteint (E2-ta) kódol, amely  
a korai gének transzkripcióját tudja stimulálni.

Ez a protein két állandó doménből áll, az aminoterminá-  
lis doménből (ennek van transzaktiváló hatása) és a karboxi-  
terminális doménből (ennek DNS-kötő és dimer képző hatása van).  
Az E2 ORF egy második reguláló proteint is kódol, az E2 transz-  
kripció represszort (E2-tr), amely az E2-ta protein egy amino-

terminálisan csonka formája. Az E2-tr-t egy másik mRNS kódolja, s a translációt indító kodon egy E2 ORF belső ATG kodon. Ha ezt a start kodont mutagenizáljuk, természetesen nem képződik E2-tr (represszor protein). Ezen represszor aktivitás nélkül a korai gének transzkripciója jelentősen megnő és ez a plazmid másolatszámának növekedéséhez vezet. Ez viszont a klónozott gén transzkripciójának növekedését eredményezi (a klónozott gént kódoló mRNS mennyisége nő) és ezáltal a protein termelés is megnövekszik.

Két új sejtvonalat ismertetünk, amelyek az FR3T3-ból és a CHO-ból származnak. Az FR3T3-ból származó sejtvonalak, amelyeket egy új expressziós vektor felhasználásával állítottunk elő, MSV enhancer/MT promoterral, már növekedést mutatott a hIL-3 termelésben az előzőekben ismertetett C127-pLB4/BPV stabil sejtvonalak (WO 88/04691) vonatkozásában. Azt találtuk, hogy ha ezt az új expressziós vektort arra használjuk, hogy a C127 sejtekből stabil sejtvonalat képezzünk, több mint 20-szoros növekedést érhetünk el. Ez utóbbi sejtvonalakkal a hIL-3 hatékony termelése valósítható meg, emlős (komplex) típusú glikozilációval.

Ezenkívül stabil CHO sejtvonalakat ismertetünk. Gyógyszer proteinek termelésére eddig még nem irták le a BPV vektorokkal kombinált CHO sejtvonalak használatát. A hIL-3 termelése ezekkel a sejtvonalakkal a legjobb ismert termelési rendszer a maga nemében. A CHO sejtek egy további előnye az, hogy

e sejtek könnyen adaptálhatók szuszpenzió formában való tenyésztéshez, majd nagy reaktorokban tömeg-tenyésztéshez. Ezenkívül a BPV vektorok ismert széles gazdasejt tartománya megkönnyíti, hogy a kívánt glükozilációtól függően válasszuk meg a sejtvonalat.

Különös módon a *Kluyveromyces lactis* eredetű hIL-3, amelyet Fractogel TSK-CM 650M használatával tisztítottunk, alacsony, de határozott kötő affinitást mutat heparin-Sepharose iránt, amint ezt SDS-PAGE (nátrium-dodecil-szulfát poliakrilamid gél elektroforézis) és immunoblotting segítségével kimutattuk. A hIL-3 affinitása a heparinhoz egy lehetséges *in vivo* kötődést jelenthet hasonló olyan mátrixokhoz (például glükóz-amino-glükánokhoz), amelyek a humán csontvelő stromában jelen vannak. A hIL-3 kötődése egy ilyen mátrixhoz, részét képezheti fiziológiai funkciójának.

A heparin-szerű és/vagy glükóz-amino-glükán szerű kötőhely(ek) jelenléte a növekedési faktorokon vagy más proteineken fontos mechanizmust kínálhat ahhoz, hogy az ilyen proteinek *in vivo* megcélozzák a csontvelő stromában vagy a szervezetben máshol - ahol szükség van a hatásukra - a specifikus mátrixokat. Második generációs proteinek kifejlesztése, amelyek új vagy jobb kötőhelyekkel rendelkeznek a fent említett mátrixok számára, fontossá válhat a gyógyszer-proteinek, mint amilyen a hIL-3, formulázása és tervezése szempontjából.

A humán IL-3 biológiai tulajdonságait részletesen tár-

gyalja a WO 88/04691 (lásd fentebb). Ez a leírás azt is megemlíti, hogy az IL-3 protein bizonyos módosításai, például az N-terminusz meghosszabbítása vagy az Ala<sup>1</sup> vagy Ala<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup> deléciója nem szüntetik meg a protein biológiai aktivitását. Azonban, bár bemutatták, hogy a hIL-3 protein egyes részei deletálhatók vagy megváltoztathatók anélkül, hogy funkciójára káros hatással lenne, azt is előre kell látni, hogy a megváltoztatott aminosav szekvenciájú hIL-3-szerű proteinek megváltozott hatást fejtenek ki a célsejtekre. Az ilyen molekulák akár mint hatóanyagok, akár mint gátló anyagok funkcionálhatnak. A proteinek mindkét csoportjának klinikai alkalmazására van lehetőség. Számos ilyen hIL-3 szerű protein megtartotta biológiai funkcióját, míg más molekulák ezt a funkciót elvesztették. Az előbbi proteinek még hatóanyagokként szolgálhatnak, és jó tulajdonságokat mutathatnak a klinikai felhasználás során, például fokozott stabilitást, jobb kötődést az IL-3 receptorokhoz és így tovább, míg az utóbbi proteinek, mint gátló anyagok jönnek számításba, például, ha egy ilyen protein az IL-3 receptorhoz kötődik, szignál transzdukció nem jön létre.

A következő példák a találmány szemléltetését célozzák, és nem korlátozzák oltalmi körét.

#### 1. példa

##### Humán IL-3 kifejeződése Bacillus fajokban.

Annak érdekében, hogy a humán IL-3 számára egy javított Bacillus expressziós vektort kapjunk, elkészítjük a pGB/IL-317

plazmid (WO 88/04691) egy származékát. Ez utóbbi plazmid az erős  $\alpha$ -amiláz promotertől 3' irányban (downstream) kódoló információt tartalmaz a Bacillus  $\alpha$ -amiláz szignál szekvencia - extra aminosavak - IL-3 szignál szekvencia - érett IL-3 és az amiláz gén 3' vége számára.

Először tökéletes kapcsolatot létesítünk az amiláz szignál szekvenciát kódoló DNS szekvencia és az érett humán IL-3-at kódoló DNS szekvencia között az E.coli bacillus pGB/IL-311 ingázó plazmidjában (WO 88/04691). Ezt a plazmidot SalI és ClaI restriktív enzimmel hasítjuk.

A humán IL-3 szignál szekvencia információját tartalmazó kis fragmentumot kicseréljük egy olyan szintetikus SalI-ClaI fragmentummal, amely az IL-3 kódoló szekvenciával fuzionált  $\alpha$ -amiláz szignál szekvencia kódoló információját tartalmazza. A kapott pGB/IL-321 plazmiddal B.licheniformis T9 sejteket transzformálunk. A transzformált sejtek csak kis mennyiségben szintetizálják az IL-3-at, de a proteint a tápoldatba szekreálják.

Izoláljuk a pGB/IL-321-ből a kis PstI-ClaI fragmentumot és beépítjük a PstI-ClaI-nyel hasított pGB/IL-317 plazmidba, s ezzel kicseréltük az extra aminosavakat és az IL-3 szignál szekvenciát kódoló DNS szekvenciát a tökéletesen összekapcsolt  $\alpha$ -amiláz szignál szekvenciával és az érett IL-3-at kódoló szekvenciával. A kapott plazmid, amely pGB/IL-322 elnevezést kapott, az IL-3 magas szinten való termelését indította meg B.licheniformis T9 transzformált sejtekben. A protein több mint

95 %-a a táptalajba szekretálódik. A tisztított protein N-terminális szekvenálása azt mutatta, hogy a transzformált sejtek által szintetizált IL-3-nak korrekt az amino-terminusza (Ala<sup>1</sup>-Pro<sup>2</sup>-Met<sup>3</sup>-). Az 1. ábra a pGB/IL-322-ben lévő hIL-3 expressziós kazetta teljes aminosav szekvenciáját és nukleotid szekvenciáját mutatja be.

Egy másik expressziós vektort, a pGB/IL-326 vektort, a következőképpen szerkesztünk meg: a pGB/IL-311-ből származó HindIII-SalI fragmentumot (a HindIII véget Klenow polimeráz segítségével töltjük be) beklónozzuk a SalI-gyel és a SmaI-gyel hasított pTZ18R-be (Pharmacia), s így kapjuk a pGB/IL-323 vektort. Az IL-3 szignál szekvenciát kódoló DNS-t a Bacillus  $\alpha$ -amiláz szignál szekvenciát kódoló szintetikus DNS fragmentumra cseréljük ki. Ebben a szintetikus DNS darabban az ATG startkodont a CAT szekvencia előzi meg, ami az NdeI restrikciós enzim számára egy hasítási helyet eredményez. Ezen pGB/IL-324 nevű plazmidból származó SphI-KpnI fragmentumot, amelyben  $\alpha$ -amiláz szignál szekvencia — érett IL-3 — amiláz terminátor van jelen, ezután beklónozzuk az SphI-gyel és KpnI-gyel hasított pBAH3-ba [a pBAH3 a pBAH1 származéka (WO 88/04691), amelyben az Ap<sup>R</sup> génből hiányzik a PstI hely]. A kapott pGB/IL-325 elnevezésű plazmidot NdeI-gyel hasítjuk, religáljuk, ezáltal az un. HpaII promotert az  $\alpha$ -amiláz szignál szekvencia — érett IL-3 kódoló szekvenciával fuzionáljuk. A kapott plazmiddal, amely pGB/IL-326 nevet kapott, B.licheniformis T9 sejteket transzformálunk. A transzformált sejtek nagymennyiségű IL-3-at termelnek, s ebből több mint 95 % a tápoldatba szekretálódik.

A következő lépések révén kapjuk a pGB/IL-341-et.

A pGB/IL-341 inszertum egy C-terminálisan csonka IL-3-at (129 aminosavból áll) kódol. A cDNS-ben az IL-3 stopkodon és az  $\alpha$ -amiláz terminátor között lévő 3' nem-kódoló IL-3 cDNS-t és az  $\alpha$ -amiláz strukturális szekvenciát kitöröljük a pGB/IL-324-ből loopingout segítségével, az alábbi oligonukleotidot használva:

5' TGA GCC TGC CGA TCT TTT GAC TGC AGT AGA AGA GCA GAG AGG  
ACG G 3'

Ez az oligonukleotid egy XhoI helyet is bevezet közvetlenül az IL-3 stopkodontól 3' irányban (downstream). A kapott plazmidnak a pGB/IL-337 elnevezést adtuk. A pGB/IL-337-ből származó NdeI-KpnI fragmentumot beklónozzuk az NdeI-KpnI-el hasított pTZ19RN E.coli vektorba. A pTZ18RN egy módosított pTZ18R, amelybe közvetlenül a lacZ ATG start kodonjánál 5' irányban (upstream) egy NdeI helyet vezetünk be az alábbi oligonukleotid segítségével:

5' CAG GAA ACA CAT ATG ACC ATG ATT 3'

A kapott plazmidot, amelyben a lacZ promotert rögtön követi az érett IL-3-mal precízen fuzionált Bacillus  $\alpha$ -amiláz szignálpeptidet kódoló szekvencia, pGB/IL-340 jelzéssel láttuk el. Ebben a vektorban az IL-3 kódoló szekvenciát looping-out révén, az alábbi szekvenciájú oligonukleotid használatával igazítjuk ki:

5' CTC AAC AGA CGA CTT TGA GCT GAC TCG AGT AGA AGA  
GCA GAG 3'

A keletkezett plazmid pGB/IL-340/1455 elnevezést kapott. Ez az E.coli plazmid tehát a hIL-3-ból csak az 1-129 aminosavakat kódolja.

E mutein számára egy Bacillus expressziós vektort szerkesztünk oly módon, hogy a pGB/IL-322-ben lévő PstI-HindIII fragmentumot a pGB/IL-340/1455-ből származó PstI-HindIII fragmentummal helyettesítjük. A kapott pGB/IL-341 plazmid megindítja a 129 aminosavból álló IL-3 mutein magas szintű termelését B.licheniformis T9 transzformált sejtekben.

A pGB/IL-322, pGB/IL-326 és pGB/IL-341 expressziós vektorokat tartalmazó transzformált B.licheniformis T9 sejtek által termelt IL-3-nak korrekt az aminoterminális szekvenciája, nincs glükozilálva és erős biológiai aktivitást mutat mind AML, mind humán csontvelő vizsgálatokban.

## 2. példa

### Humán IL-3 kifejeződése emlős sejtekben.

Megszerkesztünk egy pGB/IL-328 elnevezésű vektort, amelynek az elemei hasonlóak a Sarver és munkatársai ["Papilloma viruses: Molecular and Clinical Aspects", 515-527 oldal, Alan R. Liss Inc. (1985)] szerinti p8-4 elemeihez. Ez a vektor egy pML2 szekvenciát (BamHI-ClaI, 2623 bp), az egér MT (mMT) promoterral fuzionált MSV enhancert (ezt a fuziót Sarver és munkatársai írták le, lásd a fent idézett munkát), az IL-3 cDNS-t, az SV40 poliadenilációs szignált (lásd Sarver és munkatársai

fent idézett munkáját) és a teljes BPV-1 genomot tartalmazza.

A kívánt hIL-3 expressziós vektor előállítására céljából első lépésként a pLB4-ből (Klenow polimeráz segítségével be-töltött AvaI helyet tartalmaz) származó hIL-3 kódoló AvaII-AvaI fragmentumot az alábbi két oligonukleotidból álló szin-tetikus DNS fragmentummal együtt beklónozzuk az EcoRI-SmaI-lyel hasított pTZ18R-be (Pharmacia):

```

                    10           20           30
          5'-AATTCAGATC   TAAAAATGAG   CCGCCTGCCC
GTCCTGCTCC TGCTCCAAC  CCTG-3'
          40           50

```

```

                    10           20           30
          5'-GACCAGGAGT   TGGAGCAGGA   GCAGGACGGG
CAGGCGGCTC ATTTTATAGAT CTG-3'
          40           50

```

A kapott pGB/IL-327 plazmidot BglII-vel és BamHI-lyel hasítjuk, a hIL-3-at kódoló DNS fragmentumot izoláljuk, és be-klónozzuk az egyetlen BglII helyre a fent leírt MSV/mMT enhan- cer/promoter-től 3' irányba (downstream). A pGB/IL-328 nevű végső hIL-3 expressziós vektorban a BglII felismerő szekvenciát 4 A-csoport követi, s ezek után helyezkedik el az ATG iniciációs kodon. Az új expressziós vektor szerkesztéséhez szolgáló cDNS szekvencia 3' nem-kódoló szakaszában lévő AvaI hely használata révén az ATTA ismétlődő szakaszokat, amelyeknek a mRNS insta-bilitásában van jelentőségük [Shaw és Kamen, Cell, 46, 659-667 (1986)] nem tartalmazza a pGB/IL-328. A pGB/IL-328 plazmidot

bevisszük C127 sejtekbe hagyományos és előzőleg már közölt módszerekkel (például WO 88/04691), s ezáltal olyan stabil sejtvonalkat hozunk létre, amelyek magas szinten termelik a hIL-3-at. Ezen sejtvonalkat hIL-3 termelési szintje 20-szor magasabb, mint az előzőleg leírt pLB4/BPV-t hordozó C127 sejtekből származtatott stabil sejtvonalkaké (WO 88/04691).

A pGB/IL-328-at bevezettük FR3T3 sejtekbe is [Seif és Cuzin, Virology, 52, 721-728 (1977)] a fent leírt módszert alkalmazva. Stabil sejtvonalkat szintén elő tudtunk így állítani, de kisebb gyakorisággal. A kapott sejtvonalkaknak kisebb volt a hIL-3 termelékenysége, mint a pGB/IL-328-al transzformált C127 sejtvonalkaké.

A pGB/IL-328-at CHO sejtekbe is bevittük [R.D.Wood és J.H.Burki, Mutat, Res., 95, 505 (1984)] a korábban leírt módszer szerint. Minthogy a CHO sejtek nem képeznek helyeket olyan vektorral történő transzfekecióhoz, amely BPV-1 szekvenciákat tartalmaz, ko-transzfekeciót végeztünk pSV2neo plazmiddal [P.J. Southern, P.J.Berg, Mol.Appl.Genet., 1, 327-341 (1982)] 10:1 arányban (a pSV2neo volt a kisebb komponens), ami lehetővé tette a szelekeciót a G418-al szembeni rezisztencia alapján. A G418 rezisztens telepeket izoláltuk, és hIL-3 termelés szempontjából teszteltük. Jelentős számú klón termelt hIL-3-at. Ezután egyedi sejteket klónoztunk stabil sejtvonalkat előállítása céljából. Számos olyan sejtvonalkat állítottunk elő, amelyeknek azonos vagy jobb volt a termelékenysége, mint a legjobban termelő C127-pGB/IL-328 sejtvonalkaké. Ennek a váratlan

eredménynek nem volt előzménye korábbi munkákban.

A hIL-3 kifejezéséhez a citomegalovirus (CMV) IE enhancer/promoter kombinációt használjuk. A pES plazmidből [Z.Boom és munkatársai, J.Virol., 58, 851-859 (1986)] származó 815 bp BalI-SphI fragmentumot beklónozzuk a SmaI-SphI-gyel hasított pTZ18R-be (Pharmacia). Ezután egy BglII helyet vezetünk be közvetlenül a transzkripciót indító helynél 3' irányba (downstream), s ezt helyre irányuló mutagenézissel végezzük, a következő oligonukleotiddal:

5' GAG CTC GTT TAG TGA ACC GTC AGA TCT CCT CGA GAC GCC ATC  
CAC GCT GTT T 3'

Egy pGB/IL-329 elnevezésű expressziós vektort szerkesztünk, amely tartalmazza a pGB/IL-328-ból való pML2 szekvenciát (BamHI-EcoRI), a CMV enhancer/promoter szakaszt (EcoRI-BglII) és az SV40 poliadenilációs szignált (BglII-BamHI) (lásd Sarver és munkatársai fent idézett közleményét). A pGB/IL-330 nevű végső IL-3 expressziós szerkezetet úgy készítjük, hogy a pGB/IL-327-ből származó IL-3 kódoló BamHI-BglII fragmentumot bevezetjük a pGB/IL-329 egyetlen BglII helyére, majd ezután bevisszük a BamHI-gyel hasított BPV-1 genomot ezen expressziós vektor egyetlen BamHI helyére.

A pGB/IL-330-at C127 sejtekbe építjük be, és így olyan stabil sejtvonalakat kapunk, amelyek magas szinten termelik az IL-3-at. Igaz, hogy a kifejeződés 2-4-szer alacsonyabb, mint a pGB/IL-327 szerkezettel, de a pGB/IL-330 a mRNS-t egy rendkívül rövid, 12 nukleotidból álló 5' nem transzlatált szakasszal

hozza létre. Egy nagyobb 5' nem transzlatált szakasz bevezetése megkönnyítheti a transzlációt, mely fokozná a termelés szintjét.

A pGB/IL-330-at CHO sejtekbe [R.D.Wood, J.H.Burki, Mutat. Res., 95, 505 (1984)] is bevezettük, a fent leírt ko-transz-fekciós módszer alkalmazásával. A G418-rezisztens telepeket kiszűrtük, és hIL-3 termelésre teszteltük. A pozitív klónok egyedi sejtjeinek klónozásával stabil sejtvonalakhoz jutottunk. Váratlanul a legjobban termelő sejtvonalak ugyanolyan termelékenyek voltak, mint a legjobb CHO-pGB/IL-328 sejtvonalak, s ez azt mutatta, hogy egyrészt a mRNS rövid 5' nem transzlatált szakaszának nincs hatása a hIL-3 termelésre, másrészt, hogy a CMV enhancer/promoter sokkal hatékonyabb a CHO sejtekben.

Az előállított sejtvonalak kondicionált tápoldatában a jelenlévő IL-3 nagy aktivitást mutatott a WO 88/04691 számú nemzetközi szabadalmi leírásban ismertetett biológiai vizsgálatokban.

### 3. példa

Humán IL-3 kifejeződése humán sejtekben, módosított BPV genomot tartalmazó vektor használatával.

A BPV genom 3 proteint kódol az E2 nyílt leolvasási keret szekvenciáival, ezek neve a következő: E2-ta, E2-tr, illetve E8/E2 [Lambert és munkatársai, Ann.Rev.Genet., 22, 235-258 (1988)]. A 3091-3093 pozícióban lévő ATG kodont ki lehet

cserélni vagy egy GCG (Ala) vagy egy ACG (Thr) kodonra, így egyrészt meggátoljuk az E2-tr protein transzlációjának megindulását, másrészt az E2-ta szekvenciában a Met<sup>162</sup>-t Ala<sup>162</sup>-vel vagy Thr<sup>162</sup>-vel helyettesítjük. A pGB/IL-328-ban és a pGB/IL-330-ban lévő BPV genomot kicserélhetjük a mutáns E2-tr BPV genomokkal. A pGB/IL-328 megfelelőinek jelölése pGB/IL-331 (Ala) és pGB/IL-332 (Thr). A pGB/IL-330 megfelelőinek jele pGB/IL-333 (Ala) és pGB/IL-334 (Thr). Az új expressziós vektorokat a már leírt módon bevezetjük C127 és CHO sejtekbe. A hIL-3 termelés szintjének lényeges növekedését vártuk mindkét sejt típusban, a C127-pGB/IL-328, CHO-pGB/IL-328, illetve a C127-pGB/IL-330, CHO-pGB/IL-330 kombinációktól.

Az előállított sejtvonalak kondicionált tápoldatában lévő IL-3 erős aktivitást mutat a WO 88/04691 számú nemzetközi szabadalmi leírásban ismertetett vizsgálatokban.

#### 4.példa

##### Baktériumok által kifejezett humán IL-3 tisztítása.

###### a/ Bacillus licheniformis

Annak érdekében, hogy Bacillus licheniformis T9 (WO 88/04691) transzformált sejtekből nagymértékben tisztított és homogén hIL-3-at állítsunk elő, az alábbi eljárást alkalmaztuk. A transzformált sejtek pGB/IL-322 plazmidot tartalmaztak, ámbár pGB/IL-341-et ugyancsak használtunk ebben az eljárásban.

A *B.licheniformis* T9 sejtmentes tápoldatát 1 mól ammónium-szulfát koncentrációra állítjuk be, és pH-ját nátrium-hidroxid-oldattal 7,0-re állítjuk be. Az oldatot Fractogel TSK-butil 650C oszlopra visszük, amelyet előzőleg 10 mmólos trisz.HCl pufferrel készített 1 mólos ammónium-szulfáttal kiegyensúlyoztunk. Proteáz inhibitorként 1 mM fenil-metil-szulfonil-fluoridot (PMSF) használunk.

Míg a proteinek nagy része az átfolyt frakciókba kerül, a hIL-3-at az oszlop adszorbeálja. Az oszlopot ugyanezen pufferrel alaposan kimossuk, majd a hIL-3-at 10 mmólos trisz.HCl pufferrel (pH = 7,0) készített 1→0 mólos ammónium-szulfát grádienssel eluáljuk. A hIL-3-ban feldúsult frakciókat ammónium-szulfátos kicsapással - 70 % telítés mellett - koncentrálnak. A kapott csapadékot sótelenítjük 0,7 mS vagy ennél alacsonyabb vezetőképességig, majd egy ugyanezen pufferrel (trisz.HCl; pH = 7,8) kiegyensúlyozott Fractogel TSK-DEAE 650M oszlopon engedjük át. A hIL-3 aktivitást az átfolyt frakciók tartalmazzák, a szennyező proteinek nagy részét az oszlop megköti. A hIL-3-ban dús átfolyt frakciókat koncentrálnak (vagy egy kis Fractogel TSK-butil 650C oszlopon való adszorpció és elválasztás révén - mint leírtuk - vagy ammónium-szulfátos kicsapással), és homogenitásig tisztítjuk gélszűréssel, Biogel A (0,5 mól; 100-200 mesh) és 20 mmólos trisz.CHl-ben (pH = 7,0) oldott 200 mM nátrium-klorid, mint futtató puffer használatával (a Sephacryl S100 HR szintén hatékony mátrixnak bizonyult a hIL-3 gélszűréséhez). Ezen három lépéses tisztítási eljárás

- 1/ hidrofób kölcsönhatás, 2/ anioncserélő kromatográfia és 3/ gélszűrés - olyan hIL-3 készítményt eredményez, amely mentes a nem hIL-3 típusú proteinektól (ezüstoffestéssel előhívott SDS-PAGE és anti-hIL-3 antitestekkel végzett immunoblotting módszerrel meghatározva).

Ha hIL-3 lebomlási termékek lennének jelen a B.licheniformis T9 révén kapott kiindulási anyagban, ezeknek a proteolitikus degradációs termékeknek a szelektív eltávolítását a számunkra fontos frakcióból az alábbi tisztítási eljárással végezzük el:

1. A tisztítási eljárás első lépéséből származó hIL-3-ban gazdag frakciót a fent leírt módon koncentrálnak, pH-ját 7,8-ra állítjuk be, és vezetőképességét 0,7 mS-re visszük le. A hIL-3-at ezután azonos pH-jú és vezetőképességű trisz pufferrel kiegyensúlyozott Q-Sephadex Fast Flow (50x5 cm) oszlopra visszük fel (átfolyási sebesség: körülbelül 600 ml/óra). Ebben a tisztítási lépésben a felvitt hIL-3 tartalmú koncentrált oldat térfogata a teljes oszlop térfogatnak éppen 6-8 %-át teszi ki. Minden hIL-3 aktív formát az átfolyt folyadék tartalmaz. A hIL-3 fő formáját anti-humán IL-3 antitestek segítségével választjuk el az egyéb hIL-3-szerű kisebb proteinektól, amelyek szintén pozitívítást mutattak western blotting vizsgálatban. Ha még mindig vannak szennyező hIL-3 degradációs termékek a számunkra fontos csúcs frakcióban, megismételjük ezt az izolálási eljárást. A hIL-3 fő formája első 30 aminosavának aminosav terminális szekvencia analízise kimutatta, hogy ez a szekvencia azonos az érett protein szekvenciájával.

2. A hidroxil-apatit kromatográfia hatásos eszköznek bizonyult számos *B.licheniformis* T9 hIL-3 degradációs termék elválasztására. A hIL-3-at Biogel hidroxil-apatit oszlopra visszük fel 10 mM nátrium-dihidrogén-foszfát, 0,01 mM kalcium-klorid és 0,02 % nátrium-azid tartalmú oldatban (pH = 6,8), és az oszlopról ugyanezen oldattal készített 10 → 350 mM nátrium-dihidrogén-foszfát grádienssel eluáljuk. Ez a módszer mind analitikai mind preparatív méretben hatékonynak bizonyult.

3. A *B.licheniformis* T9 eredetű hIL-3 degradációs termékeket pBE94 poli-puffer cserélő kromatofókuszálás segítségével is el lehet választani pH grádiens alkalmazásával. Az oszlopról különböző hIL-3 degradációs termékek oldódnak le pH 6,5 és pH 8,5 között.

Egy hasonló izolálási eljárásban, amely a *B. licheniformis* T9 eredetű hIL-3 oktil-Sepharose-on való hidrofób kölcsönhatásán alapul Fractogel TSK-butil helyett, a hIL-3-at 0 % (térf./térf.) → 100 % (térf./térf.) etilén-glikol grádiens alkalmazásával oldjuk le, s ez azt mutatja, hogy ez a mátrix erősebb kötő tulajdonságokkal rendelkezik.

A fent leírt izolálási eljárásokkal kapott mindegyik hIL-3 készítmény pozitív volt a WO 88/04691 szerinti ALM-vizsgálatban.

#### b/ E.coli.

A lacZ/hIL-3 fúziós termék — amely *Escherichia coli* ban (pGB/IL-302) intracellulárisan fejeződik ki, és a zárványtestek



tárolják — izolálása céljából a sejteket 1 % (térf./térf.) oktanolt, 1 % (térf./térf.) Tx100-at, 0,1 % (tömeg/térf.) EDTA-t és 0,025 % (tömeg/térf.) lizozimet tartalmazó trisz pufferben (pH = 8,0) lizáljuk. Proteináz inhibitorként 1 mM PMSF-et (fenil-metánszulfonil-fluorid) alkalmazunk.

DNáz-zal és  $Mg^{2+}$ -mal való külön inkubálás után a nyers zárványtesteket lecentrifugáljuk (10 perc; 4.000 g) és a fent említett trisz pufferrel mossuk. Külön centrifugálás (30 perc; 10.000 g) után a zárványokból származó proteint trisz pufferben oldott 8 mólos karbamidban szolubilizáljuk redukáló körülmények között [5mM DTT (ditiotreitolt)]. A végső centrifugálás (30 perc; 27.000 g) után kapott felüluszó tartalmazza a zárványtestekben eredetileg jelenlevő hIL-3 nagy részét. E hIL-3 oldat pH-ját 5,0-re állítjuk be, és felvisszük 8 M karbamid, 5 mM DTT (pH = 5,0) tartalmú pufferrel kiegyensúlyozott Frac-togel TSK-CM 650M oszlopra. Az oszlopról a hIL-3-at ugyanezen pufferrel készített 0 → 300 mM nátrium-klorid lineáris grádiensével oldjuk ki. Az *Escherichia coli* eredetű renaturált, karbamidban szolubilizált és ioncserélő kromatográfiával részlegesen tisztított IL-3 pozitív volt egy AML-vizsgálatban.

A fenti tisztítási eljárás igen hatékonynak mutatkozott más főemlősökből származó interleukin-3 izolálására. A Rhesus IL-3-at eredményesen fejezi ki, és szekretálja a *Bacillus licheniformis*. A *Bacillus licheniformis* sejtmentes szűrletét TSK butil oszlopra visszük fel az előbbiekben leírt módon. A Rhesus IL-3-at 1 → 0 M ammónium-szulfát grádienssel oldjuk le

az oszlopról. Az IL-3 tartalmú frakciókat koncentrálnak, és DEAE Sepharose Fast Flow oszlopon kromatografáljuk úgy, ahogyan ezt a humán IL-3-nál a Q-Sepharose Fast Flow kromatográfiára leírtuk. A Rhesus IL-3 meg nem kötött frakcióját összegyűjtjük, és tisztaságát poliakrilamid gél elektroforézissel és western blotting segítségével teszteljük.

### 5. példa

#### Élesztőkben kifejeződött humán IL-3 tisztítása.

A pGB/IL-316 plazmidot (WO 88/04691) tartalmazó transzformált Kluyveromyces lactis sejtek tenyészetét lecentrifugáljuk, a hIL-3 tartalmú felülusztót megsűrjük a visszamaradt sejtek eltávolítására, majd ammónium-szulfátot adunk hozzá 1 mólos koncentrációig és pH-ját 7,0-re állítjuk be. (Proteáz inhibitorként 1 mM PMSF szolgál). Az oldatot foszfát pufferrel (pH=7,0) készített 1 mólos ammónium-szulfáttal egyensúlyba hozott oktil-Sepharose oszlopra visszük. Míg a proteinek nagy részét az átfolyt folyadék tartalmazza, a hIL-3-at az oszlop adszorbeálja. Ugyanezen pufferrel mosás következik, majd a hIL-3 részben leoldódik az oszlopról foszfát pufferrel készített (pH = 7,0) 1 → 0 mólos ammónium-szulfát gradiens alkalmazásával.

A hIL-3 fő részét, amely még az oszlopra adszorbeálva maradt, 0 % (térf./térf.) - 100 % (térf./térf.) etilén-glikol gradiens alkalmazásával oldjuk le. A hIL-3 oktil-Sepharose-on

(vagy Fractogel TSK-butil 650C oszlopon) való hidrofób kölcsönhatását alkalmazó technika igen hatékony első izolálási eljárásnak bizonyult. Az ezt követő ioncserélő kromatográfia és gélszűrés *Kluyveromyces lactis* eredetű homogén hIL-3 készítményt eredményez.

Egy hasonló eljárásban pGB/IL-316-ot tartalmazó *Saccharomyces cerevisiae* transzformált sejtek tenyésztését használva, a hIL-3-at szintén oktil-Sepharose-ról eluáltuk 0 % (térf./térf.) → 100 % (térf./térf.) etilén-glikol gradiens alkalmazásával.

Egy alternatív eljárásban a *Kluyveromyces lactis* tenyésztés sejtmentes tápoldatból a hIL-3 izolálása ammónium-szulfátos kicsapással (75 %-os telítés mellett) kezdődik, és ezzel a módszerrel az eredetileg meglévő protein össz mennyiségének csak kis részét képező hIL-3 legnagyobb része kicsapódik. Az összegyűjtött csapadékot foszfát-pufferban reszuszpendáljuk, és e pufferrel szemben dializáljuk. A hIL-3-at tartalmazó oldat pH-ját 5,0-re állítjuk be nátrium-hidroxid-oldat adagolásával, és felvisszük ugyanezen pufferrel egyensúlyba hozott Fractogel TSK-CM kationcserélő oszlopra. Míg a hIL-3 az oszlopon adszorbeálódik, a szennyező proteinek nagy részét az átfolyt frakciók tartalmazzák. Az oszlopról a humán IL-3 kioldását ugyanezen pufferrel készített 0 mM → 300 mM nátrium-klorid gradiens segítségével végezzük.

E két lépésből álló eljárással kapott frakcionált hIL-3 közel homogén volt. A glükoziláció természetéből adódóan, ha a *Kluyveromyces lactis* használjuk expressziós rendszerként, a homogenitásig tisztított hIL-3 a protein különböző molekula-tömegű formáiból tevődik össze. A fent említett élesztő expressziós rendszerekből előállított hIL-3 készítmény pozitív volt AML-vizsgálatban.

#### 6. példa

##### Emlős sejtekben kifejeződött humán IL-3 tisztítása.

Emlős sejt tenyészetből kapott hIL-3-at a tápoldatból tisztítjuk ugyanolyan módszerekkel, mint amelyeket a *B.liche-niformis*-ban kifejeződött hIL-3-nál leírtunk (4.példa). A pGB/IL-328 plazmidot tartalmazó transzformált C127 sejtek használataival előállított tápoldatot 1 mólos ammónium-szulfát koncentrációra állítjuk be, a pH-t nátrium-hidroxid-oldat adagolásával 7,0-re állítjuk be, majd felvisszük Fractogel TSK-butil 650C oszlopra (proteináz inhibitoroként 1 mM PMSF-et használunk). A hIL-3-ra feldúsított frakciókat (az oszlopra felvitt összes protein mintegy 10 %-a) 10 mmólos trisz.HCl pufferrel (pH=7,0) készített 1 → 0 M ammónium-szulfát grádienssel oldjuk le. A frakciókat ammónium-szulfátos kicsapással koncentrálnak, 60 % telítéssel. A protein csapadékot feloldjuk, és vízzel szemben dializáljuk. Ezután 20 mM trisz.CH1-t (pH = 7,8) adunk hozzá 1,4 mS vagy ennél kisebb vezetőképesség eléréséig. A hIL-3

készítményt ezután Fractogel TSK-DEAE 650M oszlopra visszük. Az átfolyt frakciók részben szintén tartalmaztak hIL-3-at. A kioldást 0 → 200 mM nátrium-klorid grádienssel végezzük. A szennyező proteinek nagy részét az oszlop megköti. Ezek a hIL-3 frakciók után oldódnak le.

Fenti kétlépéses eljárásnak ammónium-szulfátos kicsapással való kombinációja szintén koncentrált hIL-3 készítményt eredményezett, amelyben a kiindulási anyagban eredetileg jelenlevő protein összmenyiségének 1 %-a volt jelen. A készítmény AML-vizsgálatban (WO 88/04691) pozitív volt.

### 7. példa

#### Bacillus licheniformis T9-ből (pGB/IL-322) kapott hIL-3 nagybani tisztítása.

B. licheniformis T9-ből (pGB/IL-322) a hIL-3 tisztítását négy lépésből álló nagybani tisztítási séma szerint végezzük.

#### Első lépés: hidrofób kölcsönhatás kromatográfia.

A Bacillus licheniformis T9 (WO 88/04691) 6 fermentációs menetéből származó sejtmentes felülúszót, melynek összmenyisége 48 liter volt, 1 mólos ammónium-szulfát koncentrációra (pH = 7,0) állítjuk be. A humán IL-3-at trisz pufferrel (pH=7,0) készített 1 mólos ammónium-szulfáttal egyensúlyba hozott Fractogel TSK-butil 650C oszlopra (dxh = 25x8 cm) visszük fel (q = 8 liter/óra). Az oszlopot alaposan kimossuk ugyanezen

pufferrel. A hIL-3-at 10 mmólos trisz pufferrel készített 1,0 → 0,1 M ammónium-szulfát lineáris grádienssel eluáljuk (2. ábra). A hIL-3-ban feldúsult frakciókat ezután ammónium-szulfátos kicsapással — 60 %-os telítés mellett — koncentráljuk, majd a csapadékot dializissel (Spektra/Por, kizárási molekulatömeg határ: 3.500 D) — Milli Q vízzel szemben — sótalánítjuk 0,70 mS vagy ennél kisebb vezetőképesség eléréséig.

Második lépés: anioncserélő kromatográfia (először).

A hIL-3-ra feldúsított oldatot pH = 7,8-ra állítjuk be szilárd trisz adagolásával és 0,70 mS-re vagy ennél kisebb vezetőképességre. Az oldatot ezután Q-Sepharose Fast Flow oszlopra (dxh = 10x11 cm; q = 3 l/óra) visszük, melyet előzőleg trisz pufferrel (pH = 7,8) hoztunk egyensúlyba, és 0,70 mS-nél kisebb vezetőképességre állítottuk be. A hIL-3 az átfolyt frakciókban gyűlik össze, míg a szennyező proteinek nagy részét az oszlop megköti (3. ábra). A hIL-3-at ultraszűrővel (Amicon, ym5 szűrő) 25-30 mg/ml-re koncentráljuk.

Harmadik lépés: anioncserélő kromatográfia (másodszor).

Az előző lépésben kapott 60 ml, 1,5-1,8 g hIL-3 tartalmú oldatot Q-sepharose Fast Flow oszlopra (dxh = 5x90 cm); q = 0,3 l/óra) visszük. Az átfolyt frakciókban számos hIL-3 aktivitású csúcsot észleltünk. (4. ábra). A lényeges hIL-3 protein frakciót a hIL-3 degradációs termékektől elválasztjuk. A hIL-3 koncentrálását a fent leírtak szerint végezzük.

Negyedik lépés: gélszűrési kromatográfia.

Körülbelül 0,9 g hIL-3-at (a fenti lépésekből kaptuk) 10 mM nátrium-dihidrogén-foszfátot tartalmazó 140 mmólós NaCl oldattal (pH = 7,0) kiegyensúlyozott Sephacryl S100 HR oszlopra (dxh = 5 x 90 cm; q = 0,15 l/óra visszük fel. A hIL-3 egyetlen csúcsban gyűlik össze, amelyet közvetlenül a hIL-3 előtt leoldódó kismennyiségű aggregálódott hIL-3-tól elválasztunk (5. ábra).

Ezzel a tisztítási eljárással olyan hIL-3 állítható elő, amely észlelhető mennyiségű szennyező proteineket és nukleinsavakat nem tartalmaz. A hIL-3 tartalmú oldatot sótalánítjuk, majd ezután ultraszűréssel koncentrálnak a megfelelő koncentráció eléréséig.

8.példa

A rekombináns interleukin-3 vizsgálata

a/ A tisztított IL-3 plazma deszorpciós tömegspektrometriás vizsgálata.

A pGB/IL-341 eredetű és a 4. példa szerint tisztított rekombináns hIL-3-at peptid térképezéssel és tömeg spektrometriával vizsgáltuk.

A hIL-3-at proteolitikusan bontottuk különböző specifikus proteázokkal, majd a kapott peptideket reverz fázisú HPLC-vel, C18 oszlopon választottuk el. A hIL-3 peptideket plazma deszorpciós tömegspektrometriával analizáltuk. A kapott

hIL-3 peptidek molekulatömegét szekvenciáik és az ismert enzim specificitások alapján mind igazoltuk. Ezzel a módszerrel a tisztított protein primer szekvenciájáról kapott információ azonos volt a nativ proteinével (129 csoport a pGB/IL-341 esetén). Azt a következtetést vontuk le a C-terminális peptid analízise alapján, hogy a leírt tisztítási eljárással olyan terméket kapunk, amely rekombináns IL-3-at tartalmaz 98%-nál nagyobb tisztasággal.

b/ A hIL-3 in vivo hatása csimpánzokon.

A *B.licheniformis* sejtek által termelt rekombináns hIL-3-at a 4. példában leírt eljárás szerint tisztítottuk. Ezután az IL-3 oldatot pirogénmentes vízzel hígítottuk a kívánt végső koncentrációig. Csimpánzokat oltottunk szubkután ezzel az oldattal. Hét napon át naponta adott 30  $\mu$ g/kg IL-3 a trombocitaszám növekedését idézte elő, és leukocitózisra való hajlamot indukált (6. ábra). Az IL-3 hatásának — egyedüli szerként adva — ezen meglepő, nem várt eredménye az IL-3 klinikai alkalmazásának javallatát jelentheti trombocitopénia esetében.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Eljárás főemlős IL-3 aktivitású rekombináns protein tisztítására, a z z a l j e l l e m e z v e , hogy a következő lépésekből áll: hidrofób kölcsönhatás kromatográfia és ioncserélő kromatográfia.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a következő lépésekből áll: hidrofil kölcsönhatás kromatográfia, ioncserélő kromatográfia és gélszűrés, a megadott sorrendben.
3. Az 1. és 2. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a rekombináns protein humán IL-3.
4. Eljárás aminosav lánchosszúság szempontjából különböző IL-3 molekulák elválasztására, azzal jellemezve, hogy anioncserélő kromatográfiás lépést tartalmaz.
5. Eljárás aminosav lánchosszúság szempontjából különböző IL-3 molekulák — N-terminális és/vagy C-terminális végük 1-10 aminosavban különbözik — elválasztására, azzal jellemezve, hogy anioncserélő kromatográfiás lépést tartalmaz.
6. Eljárás IL-3 aktivitású lényegében tiszta protein előállítására, azzal jellemezve, hogy a szóbanforgó protein 98 %-nál nagyobb tisztaságú a C-terminális peptid térképezés és tömeg spektrometria kombinációjával meghatározva.
7. Eljárás IL-3 aktivitású lényegében tiszta protein előállítására nyers protein termékből, azzal jellemezve, hogy az

említett nyers proteint olyan rekombináns sejt állítja elő, amely IL-3-nak megfelelő DNS szekvenciát fejez ki, továbbá, hogy az eljárás a következő lépésekből áll:

a) elvégezzük az említett protein termék hidrofóg kölcsönhatás kromatografálását és összegyűjtjük az IL-3 aktivitású protein tartalmú frakciókat;

b) elvégezzük az a/ lépés frakcióinak ioncserélő kromatografálását és

c) elvégezzük — tetszés szerint — a b/ lépésben kapott proteint gélszűrési kromatografálását.

8. A 7. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett rekombináns sejt IL-3-nak megfelelő DNS szekvenciát tartalmazó bacillus vagy élesztő vagy emlős sejt.

9. A 8. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy  
a/ az említett bacillus sejt vagy pGB/IL-322 tartalmú *B.licheniformis* T9 vagy pGB/IL-326 tartalmú *B.licheniformis* T9 vagy pGB/IL-341 tartalmú *B.licheniformis* T9 sejt,

b/ az említett élesztő sejt vagy pGB/IL-316 tartalmú *K.lactis* vagy pGB/IL-316 tartalmú *S. cerevisiae* sejt,

c/ az említett emlős sejt vagy pGB/IL-328 tartalmú C127 sejt vagy pGB/IL-328 tartalmú CHO sejt vagy pGB/IL-328 tartalmú FR3T3 sejt vagy pGB/IL-330 tartalmú C127 sejt vagy pGB/IL-330 tartalmú CHO sejt.

10. Eljárás IL-3 aktivitású lényegében tiszta protein elő-

állítására nyers protein termékből azzal jellemezve, hogy az említett nyers protein IL-3-at meghatározó DNS szekvenciát kifejező rekombináns sejtéből származik, s hogy az eljárás a következő lépéseket tartalmazza:

a/ az említett proteint ammónium-szulfáttal csapjuk ki,

b/ az említett proteint tartalmazó csapadékot reszuszpendáljuk, elvégezzük az említett reszuszpendált csapadék ioncserélő kromatografálását, amely egy lényegében tiszta IL-3 aktivitású proteint eredményez és

c/ elvégezzük — tetszés szerint — a b/ lépésben kapott protein termék gélszűrési kromatografálását.

11. A 10. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy az említett rekombináns sejt IL-3-nak megfelelő DNS szekvenciát tartalmazó Bacillus, élesztő vagy emlős sejt.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy

a/ az említett Bacillus sejt pGB/IL-322 tartalmú B.licheniformis T9 vagy pGB/IL-326 tartalmú B.licheniformis T9 vagy pGB/IL-341 tartalmú B.licheniformis T9 sejt,

b/ Az említett élesztő sejt pGB/IL-316 tartalmú K.lactis vagy pGB/IL-316 tartalmú S.cerevisiae sejt,

c/ az említett emlős sejt pGB/IL-328 tartalmú C127 sejt vagy pGB/IL-328 tartalmú CHO sejt vagy pGB/IL-328 tartalmú FR3T3 sejt vagy pGB/IL-330 tartalmú C127 sejt vagy pGB/IL-330 tartalmú CHO sejt.

13. Eljárás IL-3 aktivitású lényegében tiszta protein előállítására, azzal jellemezve, hogy az említett proteint IL-3-nak megfelelő DNS szekvenciát kifejező rekombináns sejtekből kapott lizátumból állítjuk elő úgy, hogy az említett lizátumot ioncserélő kromatografálásnak vetjük alá.
14. A 13. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy a rekombináns sejt E.coli sejt, előnyösen pGB/IL-302 tartalmú E.coli sejt.
15. HIL-3 kifejezésére alkalmas vektor, azzal jellemezve, hogy a pGB/IL-321 — pGB/IL-330, a pGB/IL-331 — pGB/IL-334 és a pGB/IL-337, pGB/IL-340, pGB/IL-340/1455 és a pGB/IL-341 vektorokból álló csoportból választjuk ki.
16. BPV-1 genomot vagy ennek 69 %-os szubgenomiális fragmentumát (BamHI-HindIII) tartalmazó expressziós vektor, azzal jellemezve, hogy a BPV genomban a 3091-3093 pozícióban lévő ATC kodont non-stop kodonná, előnyösen GCG vagy ACG kodonná mutagenizáljuk.
17. A tisztított hIL-3 terápiásan hatásos mennyiségének a felhasználása, azzal jellemezve, hogy egy gyógyszerészetileg elfogadott vivőanyaggal elegyítve olyan gyógyszerkészítmény előállítására használjuk, amely emberben a trombocita szinten növeli.

A meghatalmazott:

S.G. & K.  
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI  
ÉS SZAKADALMI IRODA  
1061 BUDAPEST, DALSZÉNYI U. 10.  
TELEFON: 183-733

43 oldal + 6 oldal

Földvár

# KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

52.792/BE

6/1

10 20 30 40 50 60  
 ATATCGCGCTTTTCTTTTGGAAAGAAAATATAGGGAAAATGGTACTTCTTAAAAATTCCG

70 80 90 100 110 120  
 AATATTTATACAATATCATATGTTTCACATTGAAAGGGGAGGAGAATCATGAAACAACAA  
 MetLysGlnGln

130 140 150 160 170 180  
 AAACGGCTTTACGCCCGATTGCTGACGCTGTTATTTGCGCTCATCTTCTTGCTGCCTCAT  
 LysArgLeuTyrAlaArgLeuLeuThrLeuLeuPheAlaLeuIlePheLeuLeuProHis

190 200 210 220 230 240  
 TCTGCAGCAGCGCGGCTCCCATGACCCAGACAACGCCCTTGAAGACAAGCTGGGTTAAC  
 SerAlaAlaAlaAlaAlaProMetThrGlnThrThrProLeuLysThrSerTrpValAsn

250 260 270 280 290 300  
 TGCTCTAACATGATCGATGAAATTATAACACACTTAAAGCAGCCACCTTTGCCTTTGCTG  
 CysSerAsnMetIleAspGluIleIleThrHisLeuLysGlnProProLeuProLeuLeu

310 320 330 340 350 360  
 GACTTCAACAACCTCAATGGGGAAGACCAAGACATTCTGATGGAAAATAACCTTCGAAGG  
 AspPheAsnAsnLeuAsnGlyGluAspGlnAspIleLeuMetGluAsnAsnLeuArgArg

370 380 390 400 410 420  
 CCAAACCTGGAGGCATTCAACAGGGCTGTCAAGAGTTTACAGAACGCATCAGCAATTGAG  
 ProAsnLeuGluAlaPheAsnArgAlaValLysSerLeuGlnAsnAlaSerAlaIleGlu

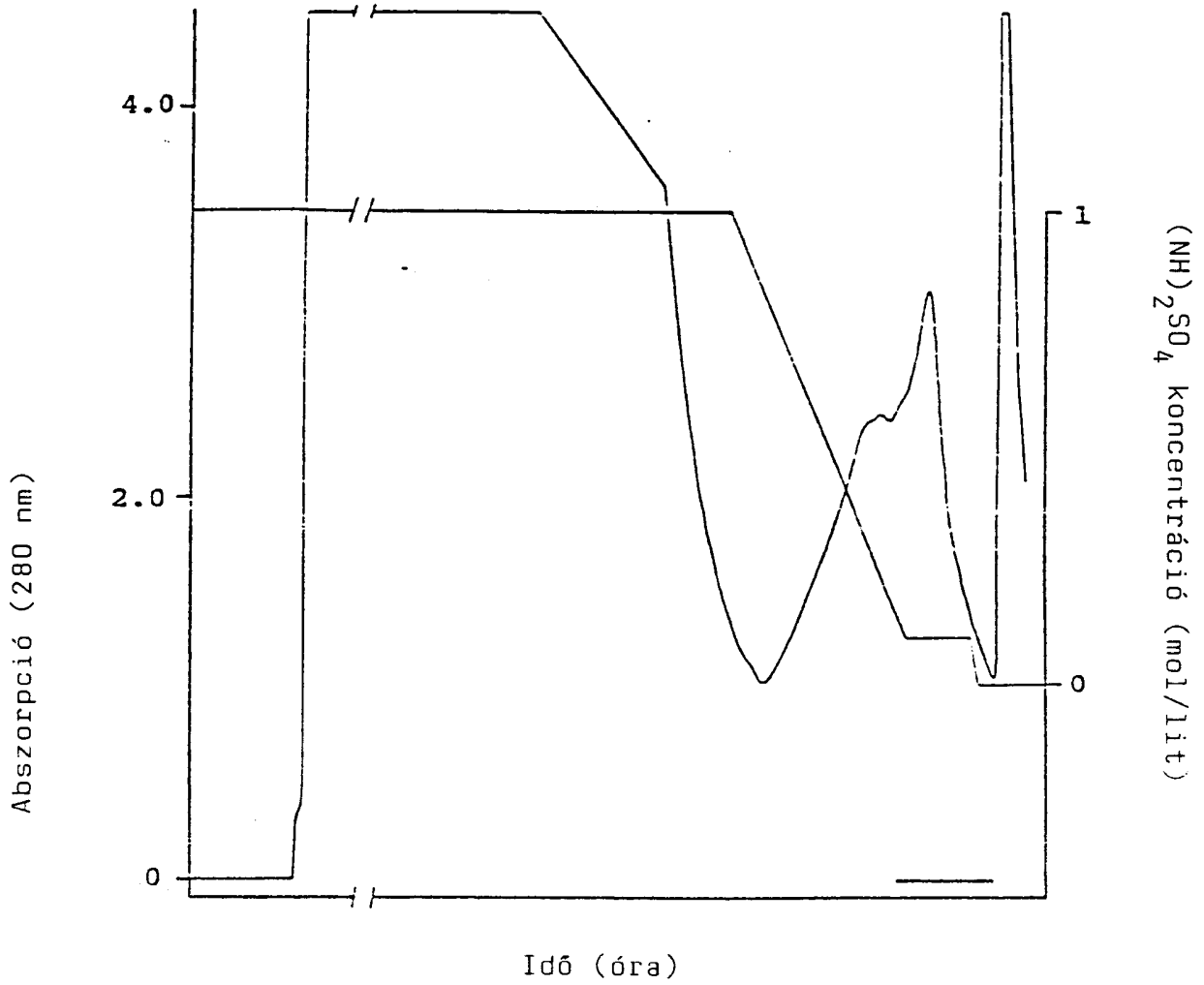
430 440 450 460 470 480  
 AGCATTCTTAAAAATCTCCTGCCATGTCTGCCCTGGCCACGGCCGCACCCACGGGACAT  
 SerIleLeuLysAsnLeuLeuProCysLeuProLeuAlaThrAlaAlaProThrArgHis

490 500 510 520 530 540  
 CCAATCCATATCAAGGACGGTGACTGGAATGAATTCCGGAGGAACTGACGTTCTATCTG  
 ProIleHisIleLysAspGlyAspTrpAsnGluPheArgArgLysLeuThrPheTyrLeu

550 560 570 580 590 600  
 AAAACCCCTTGAGAATGCGCAGGCTCAACAGACGACTTTGAGCCTCGCGATCTTTTGAGTC  
 LysThrLeuGluAsnAlaGlnAlaGlnGlnThrThrLeuSerLeuAlaIlePheEnd

610 620 630 640  
 CAACGTCCAGCTCGTTCTCTGGGCCTTCTCACCACAGAGCCTCGGG

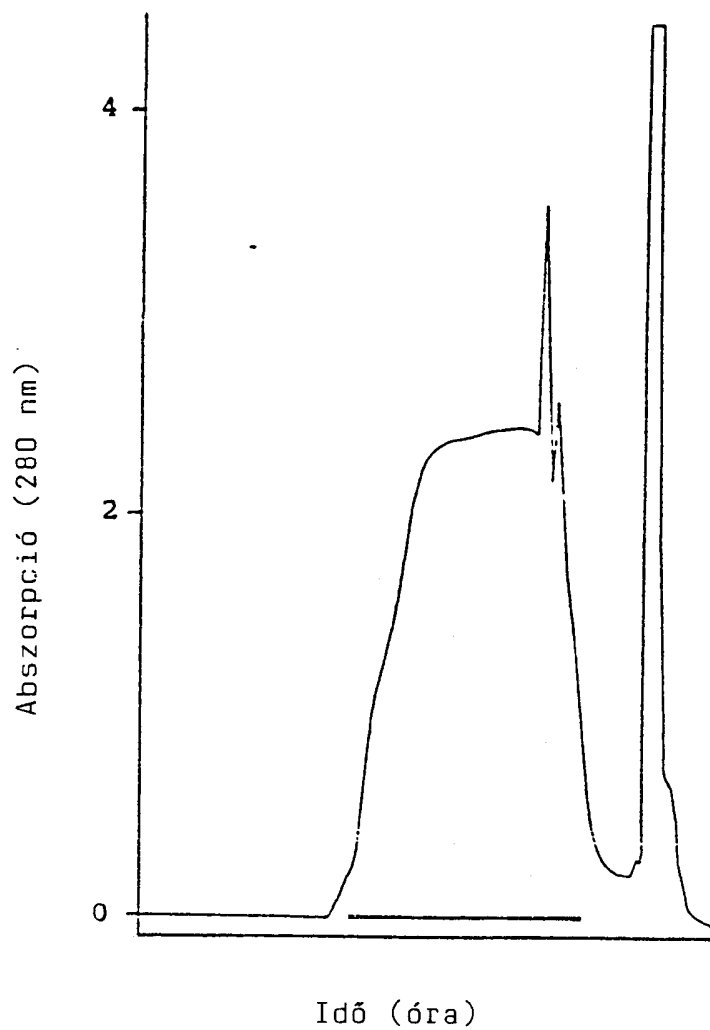
1. ábra



Hidrofób kölcsönhatás kromatográfia

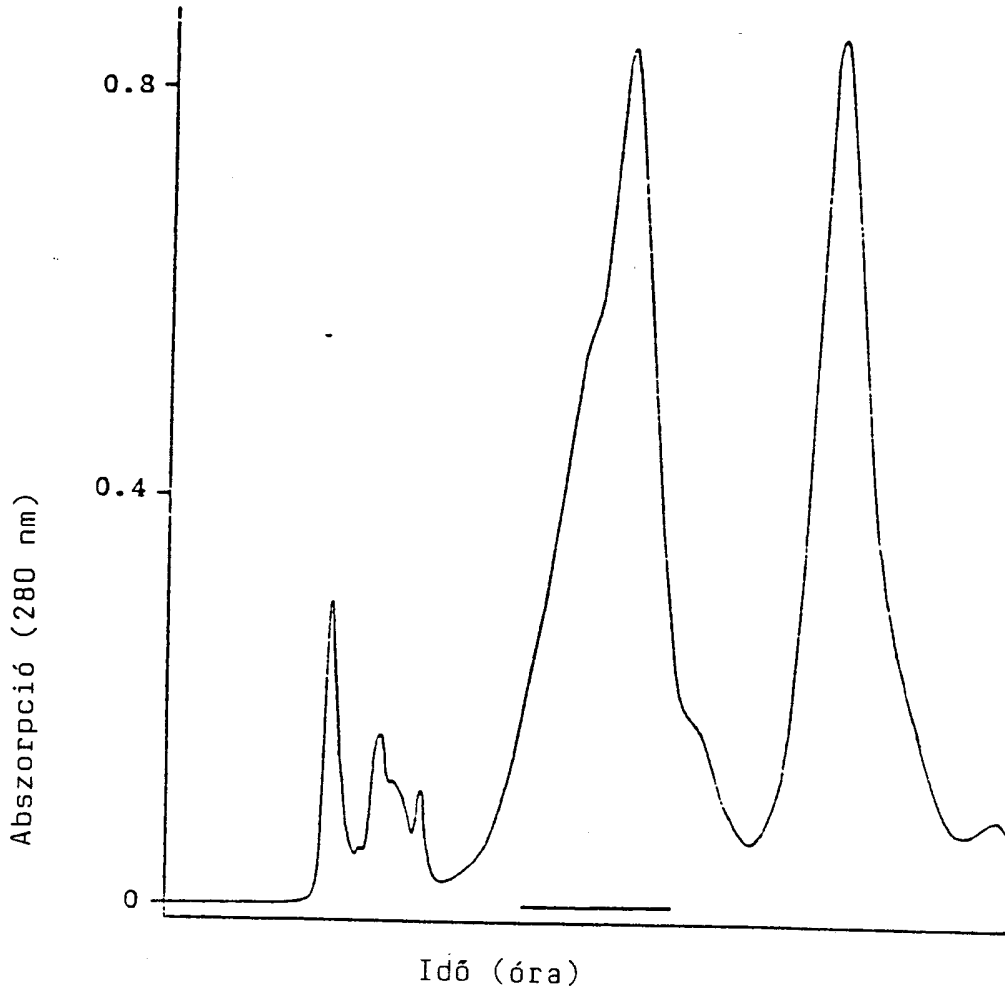
Fractogel TSK-butil 650C  
(d=25cm, h=8cm)

2. ábra



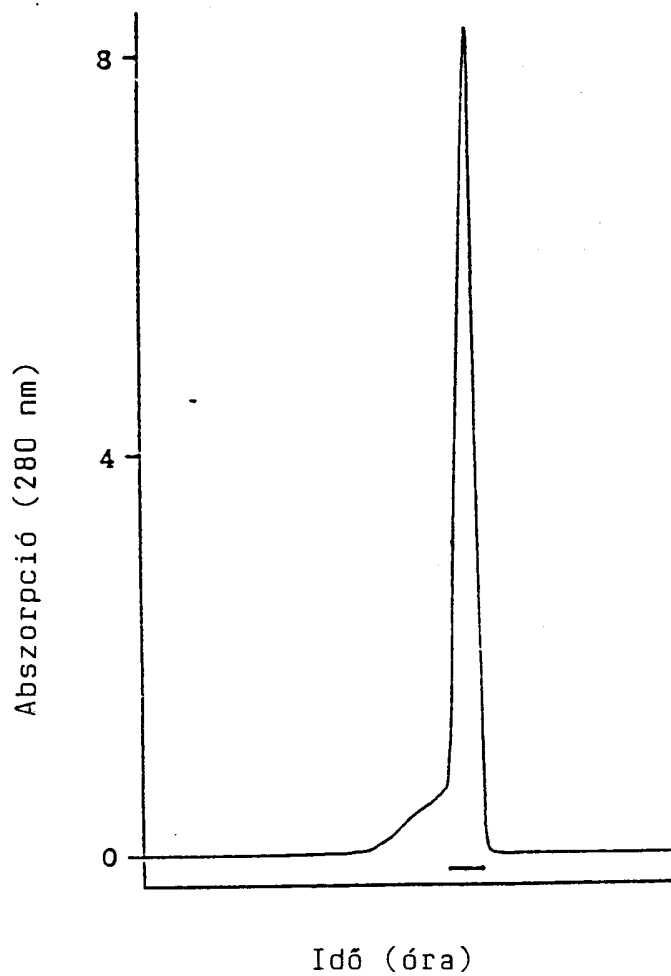
Anioncserélő kromatográfia  
 Q-Sepharose Fast Flow  
 (d=10cm, h=11cm)

3. ábra



Anioncserélő kromatográfia  
 Q-Sepharose Fast Flow  
 (d=5cm, h=90 cm)

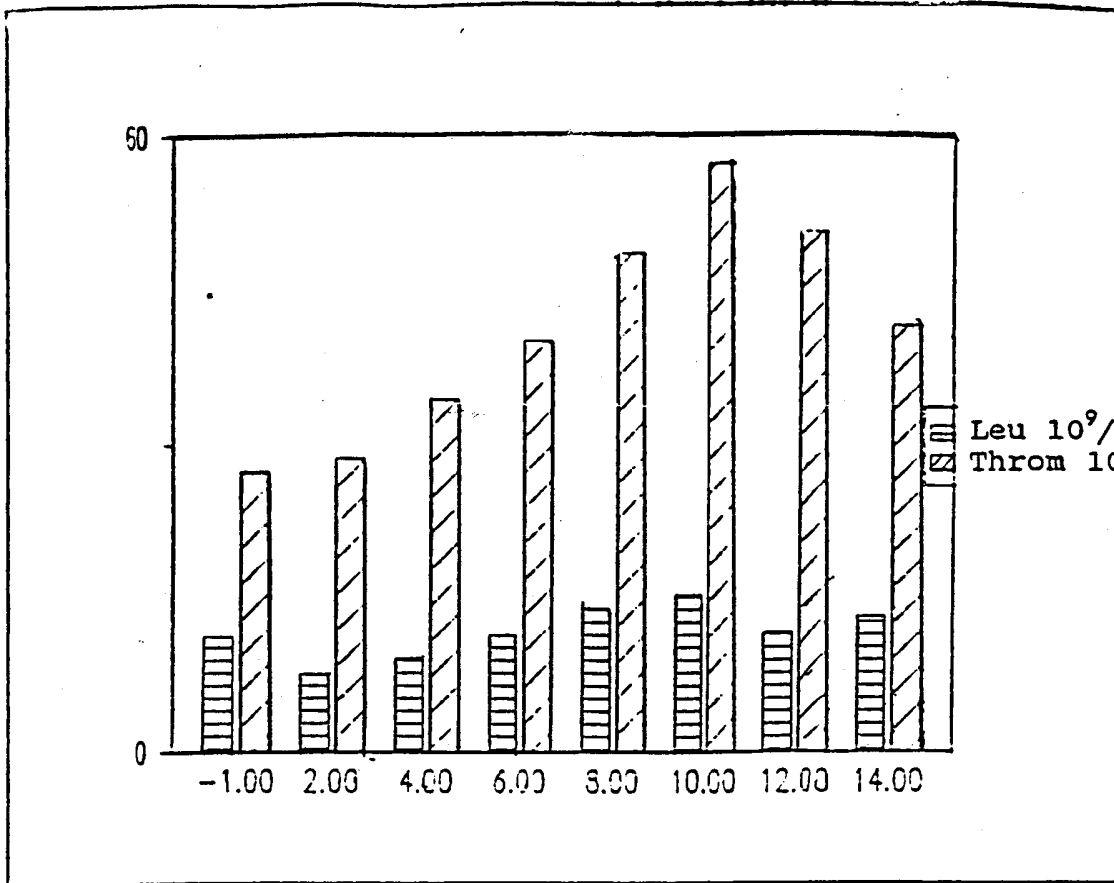
4. ábra



Gélszűréses kromatográfia  
 Sephacryl S100HR  
 (d=5cm, h=90cm)

5. ábra

*[Handwritten signature]*  
 S.B.G. & K.  
 BUDAPESTI NEMZETKÖZ ÚGYVEDI  
 ÉS SZABADALMI IRODA  
 1061 BUDAPEST, DALSZENHÁZ U. 10.  
 TELEFON: 153-3733



6. ábra

Leu = leukocita

Throm = trombocita