

40708/90

52.285/BE

KÖZZÉTÉTEL
PÉLDÁNY

7006/90

-54411-A

K I V O N A T

Eljárás humán interleukin-3 mutánsai előállítására

Gist-Brocades N.V., Delft, Hollandia

Bejelentés napja: 1990. 08. 14.

Elsőbbségei: 1989. 08. 14. (89 202082.7),

1989. 09. 14. (89 202331.8),

Európa

A találmány szerint a hIL-3 mutánsait állítják elő, amelyek a hIL-3 gyakorlatilag teljes kódoló régiójában létrehozott deléciókat foglalnak magukban, miközben megtartják biológiai aktivitásukat. Előnyös mutánsok azok, amelyek az N-terminálison (1-14 aminosavak) és/vagy a C-terminálison (116-133, 120-130 és/vagy 130-133 aminosavak) egy vagy több deléciót tartalmaznak. A mutánsoknak egy másik előnyös csoportját képezik a szubsztitúciós mutánsok. Ezen mutánsok közül néhánynak antagonista hatása van. Specifikus példák a Cys $\rightarrow$ Ala mutánsok (Cys¹⁶ $\rightarrow$ Ala¹⁶, Cys¹⁶Cys⁸⁴ $\rightarrow$ Ala¹⁶Ala⁸⁴). Más antagonista hatású mutánsok a Glu⁵⁰ $\rightarrow$ Lys⁵⁰ és Lys⁷⁹ $\rightarrow$ Glu⁷⁹. Végül a 29 és 54 aminosavak között elhelyezkedő specifikus epitópokkal szembeni antitesteket is előállítanak.

NK
glt... ala ...

43705/20

5106/20

52.285/BE

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

-54411-

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

1.4.05 CILY K/22
CILY A/02

Eljárás humán interleukin-3 mutánsai előállítására

Gist-Brocades N.V., Delft, Hollandia

Feltalálók:

DORSSERS Lambertus Christiaan Johannes, An Randwijk,

VAN LEEN Robert Willem, Nieuwerkerk a/d Ijssel,

HOLLANDIA

A bejelentés napja: 1990. 08. 14.

Elsőbbségei: 1989. 08. 14. (89 202082.7),

1989. 09. 14. (89 202331.8)

Európa

Jelen találmány tárgyát telep-stimuláló faktorok rekombináns DNS technikával előállított mutánsai képezik. A találmány specifikusan az interleukin-3 mutánsaival foglalkozik. Közelebbről olyan mutánsokkal, amelyek

egy vagy több deléciót és/vagy egy vagy több szubsztitúciót tartalmaznak. Ezen mutánsok gyógyászati alkalmazhatósága ezek specifikus receptor kötésétől és szignál-átvivő tulajdonságaitól függ.

A hematopoietikus sejtekre ható faktorokat a csontvelő sejtek proliferációjának és/vagy differenciálódásának lágy agar kultúrában való mérési vizsgálata során mutatták ki. Az ilyen aktivitással bíró faktorokat közösen telep-stimuláló faktoroknak (colony-stimulating factor, továbbiakban CSF) nevezték el. A legutóbbi időben ezt találták, hogy különböző CSF-ek vannak, amelyeket részben annak alapján lehet osztályozni, hogy milyen hematopoietikus ágat stimulálnak.

Humán és egér rendszerekben ezek a fehérjék G-CSF-et és M-CSF-et foglalnak magukban. Ezek a fehérjék stimulálják a túlnyomóan neutrofil granulociták, illetve a makrofág telepek in vitro kialakulását. Az interleukin-2 (továbbiakban IL-2) stimulálja az aktivált T-sejtek és az aktivált B-sejtek proliferációját, azonban ezt nem tekintik telep-stimuláló faktornak.

A GM-CSF és az interleukin-3 (IL-3, amely multi-CSF-ként is ismert) stimulálják a makrofág, a neutrofil és az eozinofil granulocita telepek képződését. Ezen kívül az IL-3 stimulálja a megakariocitá és a tiszta és kevert

eritroid telepek képződését [D. Metcalf, "The hematopoietic colony-stimulating factors", 1984, Elsevier, Amsterdam és D. Metcalf: Science 299, 16-22 (1985)].

A növekedési faktor által indukált sejt proliferáció bonyolult folyamat. A növekedési faktornak a sejt felületen a receptorához való igen specifikus kötődését követően a komplex endocitózissal a sejt belsejébe kerül és az egy intracelluláris válasz reakciót indukál, amelyet gyakran megelőz a receptor foszforilációja [Sibley és mtsai: Cell 48, 913-922 (1987)]. Ezek az intracelluláris jelek specifikus gén transzkripciót, végül DNS szintézist és sejt replikációt eredményeznek.

A CSF-ek különös érdekességük, minthogy terápiás lehetőséggel bírnak, amely lehetőség a hematopoietikus és limfoid törzs eredetű sejtek csökkent szintjének a normálisra való visszaállításában van.

A humán IL-3 (továbbiakban hIL-3) ilyen CSF. Az érett hIL-3 133 aminosavból áll; a fehérje egy diszulfidhidat tartalmaz, és két potenciális glikozilációs hellyel rendelkezik [Yang és mtsai: Cell 47, 3-10 (1986)]. Többek között a következő tulajdonságokkal rendelkezik:

1) Stimulálja a humán hematopoietikus őssejtek telep képződését, ahol a képződött telepeken eritroidokat, granulocitákat, megakariocitákat, granulocita makrofágokat

és ezek keverékét értjük.

2) Stimulálja a humán akut myelogén leukémia (továbbiakban AML) blasztok DNS szintézisét.

Egy fehérje alkalmazható hatóanyagait és antagonistáit abban az esetben lehet előállítani, ha a molekula szerkezete és funkciója közötti összefüggést megértettük. Általában ezt az összefüggést az aminosavak módosításával, helyettesítésével vagy deléciójával tanulmányozzák. Ezen az úton információk nyerhetők a fehérje aktivitásában fontossággal bíró egyes aminosavakról. A fehérjék fontos doménjei lehetnek az aktív hely, a fém és kofaktor kötő helyek, receptor kötő helyek, az alegység kölcsönhatásokban résztvevő aminosavak és az antigén determinánsok.

Ha a fehérje elsődleges szekvenciája már meghatározott, különböző eljárásokat lehet alkalmazni a fent említett jellemző tulajdonságok tanulmányozására. Például, ha más specieszekből származó homológ fehérjék elsődleges szerkezete a rendelkezésünkre áll, ezeket a szekvenciákat összehasonlíthatjuk. A megtartott szekvenciák gyakran jelzik bizonyos aminosavak fontosságát.

A másodlagos szerkezeteket ismert algoritmusokkal előre meg lehet jósolni. Lásd például: Hopp és Woods: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 3824-3828 (1981); Garnier és mtsai: J. Mol. Biol., 120, 97-120 (1978); Biou és mtsai: Prot. Eng., 2, 185-191 (1988); Cármenes és mtsai: Biochem. Biophys.

Res. Commun., 159, 687-693 (1989).

Ha a homológ fehérjék közötti fajtaközi homológia magas és ezek egyikének a 3D szerkezete (három dimenziós szerkezet) ismert, ebből a szerkezetből a fontos aminosavak szintén megállapíthatók.

Az elsődleges és/vagy térszerkezeti adatokat fel lehet használni a mutagenézis kísérletek megtervezéséhez. A mutagenizált fehérjék expressziója és ezen muteinek (mutagenizált fehérjék) biológiai tesztelése információt nyújt bizonyos aminosavak relatív fontosságáról.

A jelen találmány célja IL-3 mutánsok, előnyösen a fenti eljárások alkalmazásával történő előállítása, amelyek hasonló vagy javított farmakológiai tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a natív IL-3.

Humán interleukin-3

1984-ben izolálták az egér IL-3-at kódoló cDNS klónokat [Fung és mtsai: Nature 307, 233-237 (1984) és Yokota és mtsai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 1070-1074 (1984)]. Ez a cDNS nem hibridizált a humán DNS vagy cDNS klónokkal. Így feltételezhető volt, hogy az egér IL-3 (mIL-3) humán megfelelője nem létezik. Ezt a feltételezést megerősítette a humán GM-CSF aktivitásának a széles spektruma. Végül 1986-ban egy gibbon (*Hylobates agilis*) cDNS expressziós társág segítségével megkapták a gibbon IL-3 szekvenciát. Ezt a szek-

venciát később egy humán genomiális tár próbájaként használták fel. Ez bizonyítékot nyújtott az IL-3 jelenlétére emberben [Yang és mtsai: Cell 47, 3-10 (1986)].

Időközben Dorssers és mtsai [Gene 55, 115-124 (1987)] egy humán cDNS tárban találtak egy klónt, amely meglepő módon hibridizált a mIL-3-al. Ez a hibridizáció az mIL-3 és hIL-3 3'-nem-kódoló régiói közötti nagyfoku homológiának volt a következménye.

Módosított, az IL-3-tól eltérő CSF-ek

Moonen és mtsai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4428-4431 (1987)] leírták a humán GM-CSF különböző rekombináns forrásokból, így E. coliból, élesztőből és állati sejtekből történő előállítását. Vizsgálták a deglikoziláció hatását az élesztőből és állati sejtekből származó, részben tisztított expressziós termékekre. Az N-hez kapcsolt oligoszacharidok eltávolítása az immunreaktivitást 4-8-szorosára növelte. A specifikus biológiai aktivitás úgy a krónikus mieloid leukémia (chronic myelogenous leukemia, továbbiakban CML), mint a humán csontvelő vizsgálatban huszszorosára növekedett.

Kaushansky és mtsai [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 1213-1217 (1989)] megkísérelték meghatározni a GM-CSF polipeptid azon régióját (régiót), amely a biológiai aktivitáshoz szükséges. Minthogy a humán és az egér GM-CSF telep-képző vizsgálataiban nincs keresztreakció, ez a felfogás

a h- és m-GM-CSF különböző hosszúságú régióit tartalmazó hibrid DNS molekulák használatán alapul. COS sejtekben történő expresszió után a hibrid fehérjéket humán és egér telepeképző vizsgálatokban tesztelték. A GM-CSF két régióját találták a hematopoietikus funkcióban kritikusnak. Ezeket a régiókat egy amfifil hélix és egy diszulfid kötésű hurok jellemzi.

Gough és mtsai [Eur. J. Biochem., 169, 353-358 (1987)] egér GM-CSF belső deléciós mutánsokat írtak le. A mutánsok egyike sem mutatott biológiai aktivitást.

Kuga és mtsai [Biochem. Biophys. Res. Commun., 159, 103-111 (1987)] leírták a humán G-CSF mutagenézisét. Az eredmények azt mutatták, hogy a belső vagy a C-terminális régiókban lévő mutációkat tartalmazó expressziós termékek legtöbbje nem rendelkezik hG-CSF aktivitással. Másrészt (az összesen 174 aminosavból) az N-terminálison 4,5,7 vagy 11 aminosav deléciós mutánsok megtartják az aktivitásukat. Néhány N-terminális aminosav-mutáns fokozott aktivitást mutat.

Humán interleukin-1 (IL-1) deléciós mutánsait megfelelő endonukleáz restrikciós helyek és eukariota sejtekben való expresszió alkalmazásával állították elő. A polipeptid karboxi-terminális harmadik (63-as) aminosav tartalmazza az aktiv helyet [Makino és mtsai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 4572-4576 (1987)].

Az IL-1 α és IL-1 β újabb vizsgálata azt mutatta, hogy 140, illetve 147 aminosav (az összesen 153 aminosavból) szükséges a teljes biológiai aktivitáshoz [Mosley és mtsai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 4572-4576 (1987)]. Egyetlen aminosav változtatás mindkét végen a biológiai aktivitás szignifikáns csökkenését eredményezi. Azonban ezek a vizsgálatok nem adtak részletes információt az IL-1 receptor-kötő doménjeiről.

A humán interleukin-2 aktivitását jelentősen gátolja a Cys⁵⁸ és Cys¹⁰⁵ eltávolítása, a harmadik Cys csoport (125) deléciójának viszont nincs hatása [Wang és mtsai: Science 224, 1431-1433 (1984); Cohen és mtsai: Science 234, 349-352 (1986)]. Minden szubsztitúció ezen fehérje helikális feltekeredésének a meg bomlását eredményezi, amelyről megállapították, hogy a biológiai aktivitás szignifikáns csökkenését eredményezi. Az IL-2 potenciális receptor kötő helyét egy tizenegy aminosav hosszúságú peptidnek találták. Ebben a régióban egyedi aminosav szubsztitúcióknak nagymértékű hatása van [Cohen és mtsai, lásd fent; Zurawski és Zurawski: EMBO J., 7, 1061-1069 (1988)]. További mutációs analízisek bebizonyították, hogy az IL-2 különböző doménjei játszanak szerepet az IL-2 receptor komplex nagyfoku vagy csekély affinitásu kötődésében [Robb és mtsai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 7709-7713 (1988)].

Le lehet vonni azt a következtetést, hogy a CSF-ek módosításai általában a molekula biológiai aktivitásának a nagyfoku változását eredményezik, azaz a humán G-CSF

elveszti aktivitását a belső vagy C-terminális mutációk következtében. A humán G-CSF-ben 11 aminosavig terjedő, az N-terminálison (az összesen 174 aminosavból) történt deléciók nem ellentétesen hatnak az aktivitásra, ugyanez érvényes az IL-1-re, ahol a 153 aminosavból legalább 140 szükséges a teljes aktivitáshoz. Világos, hogy ezekből a molekulákból kevesebb, mint 10 % távolítható el.

Módosított IL-3

Clark-Lewis és mtsai [Science 231, 134-139 (1986)] elvégezték szintetikus egér IL-3 analógok funkcionális analizisét. Megállapították, hogy a teljes molekula stabil harmadlagos szerkezete szükséges a teljes aktivitáshoz. A diszulfidhidak szerepének a vizsgálata szerint a négy Cys csoportból kettőt alaninnal helyettesítve (Cys⁷⁹, Cys¹⁴⁰ → Ala⁷⁹, Ala¹⁴⁰) az aktivitás megnövekedését eredményezi [Clark-Lewis és mtsai: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 7897-7901 (1988)].

A hIL-3 javasolt módosításai az irodalomban ritkák. A hIL-3 megvalósított módosításai még inkább ritkák. A WO 88/00598 közzétételi számú nemzetközi szabadalmi bejelentés egy "természetben előforduló" Ser²⁷ → Pro²⁷ helyettesítést ír le. (Meg kell jegyezni, hogy az aminosavak számozása a WO 88/00598-ban magában foglalja a 19 aminosavból álló szignálpeptidet.) Felmerült továbbá az ötlet a Cys Ser-el való helyettesítésre és ezáltal a diszulfidhid hasítására és a glikozilációs helyen lévő egy vagy több aminosav helyettesítésére (Asn³⁴ Cys³⁵ Ser³⁶ és Asn⁸⁹ Ala⁹⁰ Ser⁹¹).

Az EP-A 0275598 szabadalmi bejelentés

(WO 88/04691) szerint az Ala¹-et deletálni lehet, miközben a biológiai aktivitás megmarad. Néhány mutáns hIL-3 szekvenciát megadnak, nevezetesen két kettős mutánst, az Ala¹ → Asp¹, Trp¹³ → Arg¹³ (pGB/IL-302) és Ala¹ → Asp¹, Met³ → Thr³ (pGB/IL-304) és egy háromszoros mutánst, az Ala¹ → Asp¹, Leu⁹ → Pro⁹, Trp¹³ → Arg¹³ (pGB/IL-303) mutánsokat (a számozás az érett fehérje első aminosavánál kezdődik).

A WO 88/05469 leírja, hogyan lehet előállítani a fent említett deglikozilációs mutánsokat és az Arg⁵⁴ Arg⁵⁵, valamint az Arg¹⁰⁸-Arg¹⁰⁹ Lys¹¹⁰ mutánsokat (a számozás azonos az EP-A-0275598-ban alkalmazottal). Az utóbbit azon meggondolás alapján készítették, hogy elkerüljék a *Saccharomyces cerevisiae* expresszió során a KEX2 proteáz okozta proteolizist. Nem írnak le mutált fehérjéket. A glikoziláció és a KEX2 proteáz aktivitás csak az élesztőben történő expresszió esetében bír fontossággal.

Végül az EP-A-0282185 szabadalmi bejelentés különböző mutánsokat említ meg, amelyek a konformáció és antigenitás szempontjából semlegesek. Ennek elérése céljából sorozat szinonim aminosav szubsztitúciót javasolnak. A javasolt aminosav változtatásoknak a célja a szerkezet megtartása és az IL-3 molekula töltés eloszlásának a változatlanul tartása. Csak a Met² → Ile² és az Ile¹³¹ → Leu¹³¹ mutációkat végezték el. Nem közlik, hogy a tervezett neutralitást megtartották-e.

Mostanáig nem ismertek a hIL-3 mutagenézisével kapcsolatos kiterjedt kísérletek.

A jelen találmány a farmakológiai érdekességgel bíró vegyületek két új osztályát adja meg, nevezetesen a hIL-3 deléció és szubsztitúció mutánsait, amelyek a hIL-3-hoz hasonló biológiai aktivitásúak és néhány esetben azzal antagonisták hatásúak.

A találmány egyik tárgyát képezik az interleukin-3 (továbbiakban "hIL-3" mutánsként vagy "mutein"-ként jelöljük) biológiailag aktív olyan analógjai, amelyek legalább két aminosav deléciót tartalmaznak.

Előnyös mutánsok azok, amelyek az N-terminálison (1-14 aminosavak) és/vagy C-terminálison (120-130 és/vagy 130-133 aminosavak) egy vagy több deléciót tartalmaznak.

A jelen találmány egy másik tárgyát a hIL-3 azon szubsztitúció mutánsai képezik, amelyek az alábbiakban megadott szubsztitúciók közül legalább egyet tartalmaznak:

Asp ²¹ Glu ²²	->	Lys ²¹ Arg ²²
Asp ³⁶	->	Arg ³⁶
Glu ⁴³ Asp ⁴⁴	->	Lys ⁴³ Arg ⁴⁴
Arg ⁵⁴ Arg ⁵⁵	->	Glu ⁵⁴ Asp ⁵⁵
Asp ⁴⁶	->	Lys ⁴⁶ vagy Arg ⁴⁶
Glu ⁵⁰	->	Lys ⁵⁰ vagy Arg ⁵⁰
Glu ⁵⁹	->	Lys ⁵⁹ vagy Arg ⁵⁹
Glu ⁵⁹	->	Gly ⁵⁹ vagy Pro ⁵⁹
		(α -helix megtörő)

Arg ⁶³ Ala ⁶⁴	->	Pro ⁶³ Gly ⁶⁴
Glu ⁷⁵	->	Arg ⁷⁵ vagy Gly ⁷⁵
Lys ⁷⁹	->	Glu ⁷⁹
Arg ⁹⁴	->	Pro ⁹⁴
His ⁹⁸ Lys ¹⁰⁰ Asp ¹⁰¹	->	Glu ⁹⁸ Asp ¹⁰⁰ Gln ¹⁰¹
Glu ¹⁰⁶	->	Lys ¹⁰⁶
Arg ¹⁰⁸ Arg ¹⁰⁹ Lys ¹¹⁰	->	Glu ¹⁰⁸ Asp ¹⁰⁹ Glu ¹¹⁰
Phe ¹¹³ Tyr ¹¹⁴	->	Ala ¹¹³ Thr ¹¹⁴
Cys ¹⁶	->	Ala ¹⁶
Cys ⁸⁴	->	Ala ⁸⁴
Cys ¹⁶ Cys ⁸⁴	->	Ala ¹⁶ Ala ⁸⁴

A jelen találmány egy másik tárgyát a hIL-3 olyan szubsztitúciós mutánsai képezik, amelyek hatásosabbak a receptor kötésben, mint a DNS szintézis stimulálásában, így antagonistákat foglalnak magukban. Még pontosabban, ezek egyszeri vagy kettős Cys mutánsok. Előnyösen a Cys-t Ala-val helyettesítjük (Cys¹⁶ → Ala¹⁶, Cys¹⁶Cys⁸⁴ → Ala¹⁶Ala⁸⁴). Más antagonistá hatású mutánsok a Glu⁵⁰ → Lys⁵⁰ és a Lys⁷⁹ → Glu⁷⁹.

A fenti polipeptideket megfelelően módosított DNS szekvenciák expressziójával nyertük. Ezen kívül a jelen találmány megfelelő expressziós vektorokat és az ezekkel kompatibilis gazdasejteket is megad.

Egy további tárgyát képezik a találmánynak olyan gyógyszerkészítmények, amelyek a hIL-3 fent leírt biológiai aktivitással rendelkező peptid analógokat gyógyászati lag megfelelő vivőanyagokkal kombinálva tartalmazzák.

Végül a jelen találmány vonatkozik olyan monoklonális antitestekre is, amelyek a 29. és 54. aminosavak között elhelyezkedő epitópokkal szemben hatásosak.

Mind ezeket és más szempontokat a következő részletes leírásban vázoljuk.

Az ábrák rövid magyarázata:

1. ábra: A pGB/IL-336 fúziós fehérje inszertumának nukleotid- és transzlatált aminosav-szekvenciája. A kisbetűvel jelzett aminosavak nem hIL-3 aminosavak, az IL-3 fehérje szekvenciája az Ala-nál kezdődik.

2. ábra: A pGB/IL-339 előállítás céljából bevezetett 5' és 3' szekvencia változások. Az 1. ábrával azonos módon a kisbetűvel írott aminosavak nem hIL-3 aminosavakat jelölnek, az érett IL-3 fehérje szekvenciája az Ala¹-nél kezdődik.

3. ábra: A következő 19 IL-3 mutáns poliakrilamid-gél elektroforetikus képének fényképe (1-19 oszlopok): pGB/IL-336, pGB/IL-339, 932, 810, 934, 812, 935, 813, 936, 820, 937, 821, 938, 822, 939, 9329, 904, 905, 9045 és a Pharmacia LMW marker (20. oszlop). Az ezeknek a számoknak megfelelő mutációk a 4. táblázatban találhatók.

4. ábra: az IL-3 (*) és IL-3 821-es mutáns (*) AML proliferációs vizsgálata.

5. ábra: IL-3 receptor kötési kísérlet. Radioaktív jelzéssel ellátott IL-3 betegek AML blasztjaihoz való kötődését nem jelzett IL-3 fehérje (referencia készítmény)

kötődésével hasonlítottuk össze. A kísérletben észlelt nem specifikus kötődés szinteket (alsó oszlop) és a maximális teljes kötődést (felső oszlop) megadjuk (lásd 5. példa).

6. ábra: A kiválasztott mutáns IL-3 fehérjék relatív biológiai aktivitásának (üres oszlopok) és a relatív kötődési aktivitásnak (fekete oszlopok) összehasonlítása. Az aktivitást a referencia IL-3 készítmény aktivitásának a százalékában adjuk meg. (4. táblázat).

A találmány részletes leírása:

Az itt alkalmazott humán IL-3 az 1. ábrában megadott aminosav-összetételű (1-133). A természetben előforduló variánsok szintén ide tartoznak. Továbbá, azon hIL-3 molekulák esetében, amelyek post-tranzlációsan módosítottak (pl. glikozilációval), szintén az IL-3 jelzést alkalmazzuk. Az IL-3 származékok alatt minden olyan IL-3 molekulát értünk, amelyek kémiai vagy enzimatis uton módosítottak, és megőrizték biológiai aktivitásuknak legalább egy részét.

Az itt alkalmazott IL-3 analógok azon molekulákat jelentik, amelyek szerkezete egy vagy több deléció vagy szubsztitúció következtében eltér az érett IL-3-tól.

A humán IL-3-at továbbá azon biológiai aktivitással jellemezzük, amellyel stimulálja a humán hematopoietikus őssejtek telepképzését. A képződött telepek lehetnek eritroidok, granulociták, megakariociták, granulocita makrofágok és ezek keverékei. A hIL-3 biológiai aktivitását (a jelen célból) még két csoportra lehet felosztani: szignál

transzdukcióra és receptorhoz való kötődésre.

Jobb tulajdonságokkal rendelkező hIL-3 analóg alatt olyan analógot értünk, amelynek kedvezőbb a szignál transzdukáló/receptor kötődési aránya. Ahol a "jobb" a kívánt tulajdonságoktól függ. Például egy nagyobb kötődési koefficiens egy antagonistá esetében vagy egy egyenlő vagy nagyobb biológiai aktivitása egy deléció mutáns esetében kívánt. A jobb azt is jelentheti, hogy a polipeptid analóg kevésbé érzékeny aggregátumok képződésére.

A jelen célokra a humán IL-3 analógok (biológiai) aktivitását humán akut mieloid leucémia sejtek által DNS szintézis alapján határozzuk meg. A receptor kötődési vizsgálatokat pedig donor leukocitákkal, betegek AML sejtjeivel vagy MV4-11 sejtekkel végeztük.

Az IL-3 a receptor kötődési és a transzdukciós vizsgálatok szerint aktív. Ha lehetséges lenne ezeket az aktivitásokat specifikus aminosav szekvenciáknak tulajdonítani, amelyek lehetnek folyamatosak vagy megszakítottak, lehetségesé válna szétválasztani, a kötődési és a szignál transzdukciós aktivitásokat. Ez lehetővé tenné specifikus IL-3 receptor antagonisták előállítását.

Ennek a célnak az elérését szolgáló első lépésként a hIL-3 szerkezete és funkciója közötti összefüggés alapos ismeretére van szükség. A természetben előforduló vagy a természetes mutált IL-3 tulajdonságai megváltoztathatók a fehérjében végrehajtott különböző mutációkkal. Az

ilyen változtatásokat megfelelően el lehet végezni az itt leírt mutagén technikákkal és a mutált molekulákat (hIL-3 muteinek) megfelelően lehet szintetizálni a leírt expressziós vektorokkal. A szerkezet és funkció közötti összefüggés meghatározása céljából többek között a következő mutagén technikákat lehet alkalmazni:

- a) Egy aminosav helyettesítése különböző funkciójú izoszterikus csoporttal, például Asp helyettesíthető Asn-el. Ez megtartja a hidrogén-kötési tulajdonságokat, miközben megszünteti a töltést.
- b) Egy aminosav helyettesítése egy másik azonos funkciójú, de eltérő szerkezetűvel, például Glu Asp-al való helyettesítése, amikor a karboxicsoporthoz $1 \text{ \AA}$ távolságra kinyúlik.
- c) Egy aminosav helyettesítése egy másikkal, amelynek eltérő a funkciója.
- d) Diszulfidhidak bevitele vagy eltávolítása.
- e) Deléciós mutánsok szerkesztése.
- f) Hélix megtörők (például Pro) bevitele.
- g) Inszerciós mutánsok szerkesztése.
- h) Glikozilációs mutánsok előállítása.

A jelen találmány egyik tárgya egy specifikus antagonisták kifejlesztése, amely blokkolja a receptort ahhoz

specifikusan kötődve, előnyösen magas kötési koeficienssel, és ezáltal meggátolja a szignál transzdukciót.

Egy antagonista lehet bármilyen kémiai molekula, amely kötődik a receptorhoz, és ezáltal megakadályozza a hatóanyag kötődését. A jelen találmány specifikus célját jelentik olyan fehérjék, amelyek ilyen blokkoló hatással rendelkeznek. A jelen találmány tárgyának egyike egy hIL-3 mutein, amely legalább egy részlegesen antagonista hatással rendelkezik. Még specifikusabban, ezek egyszeres vagy kettős Cys mutánsok. Előnyösebben a Cys Ala-val helyettesített ($\text{Cys}^{16} \rightarrow \text{Ala}^{16}$, $\text{Cys}^{16}\text{Cys}^{84} \rightarrow \text{Ala}^{16}\text{Ala}^{84}$). Más antagonista hatású mutánsok a $\text{Glu}^{50} \rightarrow \text{Lys}^{50}$ és a $\text{Lys}^{79} \rightarrow \text{Glu}^{79}$ mutánsok. Előre feltételezhető, hogy a fenti mutánsok szignifikáns adagjának az alkalmazása esetében az ki fogja védeni a fiziológiailag rendelkezésre álló IL-3 kötődését, és ezáltal fejti ki antagonista aktivitását.

A jelen találmány egy másik tárgya hIL-3 vagy hIL-3-szerű aktivitású fehérjék biztosítása, amelyek kisebbek, előnyösen körülbelül 3-25 %-al, mint a natív hIL-3 molekula. Amint a későbbiekben a példákkal bemutatjuk, specifikus de-léciókkal meghatározható, hogy mely része a molekulának nélkülözhetetlen a receptor kötéshez és a szignál transzdukcióhoz.

A jelen találmány egy további tárgya az aminosavak szubsztitúciója, ez szintén lehetővé teszi azon aminosav meghatározását, amelyek fontosak a receptor kötésben

és/vagy a szignál transzdukcióban.

A mutánsok két specifikus fajtáját állítottuk elő: a) deléciós mutánsok és b) szubsztitúciós mutánsok. Könnyen megérthető, hogy ezen mutációk kombinációja könnyen előállítható az említett módszerekkel.

Deléciós mutánsokat állítottunk elő lényegében a teljes kódoló régióval. Az itt alkalmazott deléciók bármilyen aminosav deléciói lehetnek, amelyek minimálisan két egymást követő (vagy különálló) aminosavból állnak. Előnyösen négy vagy több aminosav deletálható. Az adott deléciók a molekulában lévő bármely aminosavval kezdődhetnek (kivéve természetesen a C-terminális közelében levőket). Az is lehetséges, hogy a molekulában két különálló deléció történik (azaz kétszer egy aminosav deléciója, vagy kétszer két aminosavé, stb.) A legelőnyösebb megvalósítások egyikében 32 aminosavat deletáltunk, 14-et a fehérje N-terminálisánál és 18-at a C-terminálisánál. Meglepő módon mindegyik kifejezett deléciós mutáns fehérje specifikus IL-3 biológiai aktivitást mutat, de legtöbbjük erősen csökkent mértékben. Ezért le lehet vonni azt a következtetést, hogy a fehérjében nincs egy egyedüli, folyamatos peptid domén, amely a receptorral kötődik.

A mutánsok közül négy, az 1-14 aminosav hiányos N-terminális deléciós mutáns, a 120-130 aminosav hiányos C-terminális deléciós mutáns, ezek kettős mutánsa és a 130-133-as C-terminális deléciós mutáns, olyan biológiai és kötődési aktivitást mutat, amely összehasonlítható a natív IL-3 mole-

kulával. Meglepő-, hogy az egészen 25 aminosav számig (a hIL-3 teljes hosszának körülbelül a 20 %-a) még megtartja a teljes aktivitását. A Cys¹⁶-ot figyelembe véve, amely résztvesz a diszulfidhid képzésben, az várható, hogy az N-terminálison egy 15 aminosav deléciójával keletkezett mutáns megtartja a teljes aktivitását. A kettős deléciós mutánsok, amelyekből hiányzik az N-terminálison 14, és a C-terminálison akár 18 aminosav is (4. táblázat, X és Z), még megtartják teljes aktivitásukat. Az ilyen mutánsok amelyekből hiányzik 32 aminosav is, közelítőleg a nativ molekula 25 %-át nem tartalmazzák. Minthogy ez a kettős mutáns megtartja a teljes aktivitást, azt kell várnunk, hogy a C-terminálison 18 aminosavat nem tartalmazó mutáns szintén teljes mértékben aktív lesz.

Olyan mutánsokat is előállítottunk, amelyek csak belső deléciókat tartalmaznak. A jelen találmányban leírunk egy belső deléciós mutánst, amely megtartja a teljes aktivitását, ez a mutáns nem tartalmazza a 120-tól 130-ig elhelyezkedő aminosavakat (4. táblázat, 939). Valószínű, hogy több ilyen mutánst lehet előállítani. Az előállítás szempontjából megfontolva előnyös lehet megtartani az érett IL-3 fehérje elős néhány aminosavát. Minthogy a 14 aminosavat nem tartalmazó N-terminális deléciós mutáns megtartja teljes aktivitását, azt vártuk, hogy az N-terminális régióban egy belső deléciós mutáns szintén megtartja az aktivitását. Egy másik régió, ahol eredményesnek látszott

egy deléció megvalósítása, a Gln²⁹ - Leu³⁵ régió.

Az 1-től 7 aminosavakig terjedő deléció, esetleg kombinálva a Lys²⁸ → Pro²⁸ szubsztitúcióval a belső deléciós mutánsok egy újabb csoportját adhatják.

Az a felfedezés, hogy a hIL-3 aktivitása megmarad a fent leírt kettős mutánsokban vagy bármely más mutáns esetében, amelyből a fehérje nagyobb részei hiányoznak (azaz közelítőleg 25 %), egy másik lehetséges előnnyel is bír. Egy hIL-3-at tartalmazó gyógyszerkészítményt parenterálisan, intravénásan vagy szubkután lehet alkalmazni. Biológiai úton lebontható polimerből álló hidrogélben lévő polipeptid folyamatos felszabadulás limitált a bezárható polipeptid mennyisége által. A polipeptid egy deléciós mutánsát alkalmazva, amely specifikus aktivitása magasabb, azzal jár, hogy molekulárisan több aktív anyagot lehet bezárni ugyanolyan térfogatba és ezáltal növelni lehet a beadások közötti időtartamot vagy esetleg elkerülhetővé lehet tenni az ismételt beadásokat.

A szubsztitúciós mutánsokat úgy állítottuk elő, hogy a DNS szinten specifikus mutációkat végeztünk és ezáltal a kódolt fehérjébe aminosav szubsztitúciókat vittünk. Ezek a szubsztitúciók elvégezhetők azokban a régiókban, amelyek fontosak a fehérje konformációjához vagy aktivitásához. Egy ilyen mutációra példa az, amelyben a Cys¹⁶ és Cys⁸⁴ közötti diszulfidhid felhasad. A cisztein csoportok egyikét (vagy mindkettőt) alaninnal helyettesítve a hid nem tud kialakulni,

ami nagymértékben csökkent aktivitást eredményez. A lehetséges mutánsok közül mind a hármat előállítottuk, és ezek egy viszonylag magas kötődési aktivitást mutattak (összehasonlítva a biológiai aktivitással) a receptor kötési vizsgálatokban. Minthogy a relatív kötődési aktivitás és a relatív biológiai aktivitás különböző arányait találtuk (4. táblázat), előnyös lehet a fent leírt IL-3 analógok kombinációinak az alkalmazása. Továbbá, előnyös lehet olyan polipeptid analógok alkalmazása, amelyek mindegyike egy vagy több deléciót és egy vagy több szubsztitúciót tartalmaz.

A diszulfidhid felhasítása az adott fehérje 3D szerkezetének lényeges változását eredményezi, más aminosav szubsztitúciók szintén befolyásolják ezt a szerkezetet és így az aktivitást is.

A másodlagos szerkezet vizsgálata (cirkuláris dikroizmus) azt mutatta, hogy a hIL-3 molekula nagy százalékban (70 % 20 °C-on) α -hélixből áll. A másodlagos szerkezet előre jelzését szolgáló programok [lásd: Hopp és Woods: Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78, 3824-3828 (1981); Garnier és mtsai: J. Mol. Biol. 120, 97-120 (1978); Biou és mtsai: Prot. Eng., 2, 185-191 (1988); Cármenes és mtsai: Biochem. Biophys. res. Commun., 159, 687-693 (1989)] alapján feltételezhető, hogy ezek az α -hélixek a következő aminosavak között helyezkednek el: Met¹⁹-His²⁶, Gly⁴²-Arg⁵⁵, Leu⁵⁸-Glu⁶⁹, ala⁷¹-Leu⁸¹, Leu⁸⁷-His⁹⁵, His⁹⁸-Leu¹¹¹ és Leu¹¹⁵-Ala¹²¹.

Az α -hélixekben lévő töltés-eloszlást tekintve és minthogy lehetséges, hogy ezek a töltések fontos szerepet játszanak a receptorral való kölcsönhatásban, a következő "töltést változtató" szubsztitúciókat is tartalmazza a jelen találmány:

Asp ²¹ Glu ²²	->	Lys ²¹ Arg ²²
Asp ³⁶	->	Arg ³⁶
Glu ⁴³ Asp ⁴⁴	->	Lys ⁴³ Arg ⁴⁴
Arg ⁵⁴ Arg ⁵⁵	->	Glu ⁵⁴ Asp ⁵⁵
Asp ⁴⁶	->	Lys ⁴⁶ vagy Arg ⁴⁶
Glu ⁵⁰	->	Lys ⁵⁰ vagy Arg ⁵⁰
Glu ⁵⁹	->	Lys ⁵⁹ vagy Arg ⁵⁹
Glu ⁵⁹	->	Gly ⁵⁹ vagy Pro ⁵⁹ (α -hélix törő)
Arg ⁶³ Ala ⁶⁴	->	Pro ⁶³ Gly ⁶⁴
Glu ⁷⁵	->	Arg ⁷⁵ vagy Gly ⁷⁵
Lys ⁷⁹	->	Glu ⁷⁹
Arg ⁹⁴	->	Pro ⁹⁴
His ⁹⁸ Lys ¹⁰⁰ Asp ¹⁰¹	->	Glu ⁹⁸ Asp ¹⁰⁰ Gln ¹⁰¹
Glu ¹⁰⁶	->	Lys ¹⁰⁶
Arg ¹⁰⁸ Arg ¹⁰⁹ Lys ¹¹⁰	->	Glu ¹⁰⁸ Asp ¹⁰⁹ Glu ¹¹⁰
Phe ¹¹³ Tyr ¹¹⁴	->	Ala ¹¹³ Thr ¹¹⁴

A deléció és a szubsztitúció mutánsok mindegyike alkalmas lehet a glikozilációs helyek megváltoztatására. Így kívánság szerint lehetővé tehető glikozilált vagy nem-glikozilált polipeptidek termelése az eukarióta gazdas sejtekben.

A fent leírt mutánsokat felhasználtuk az epitop térképezési kísérletekben abból a célból, hogy meghatározzuk a molekula azon szegmentjeinek a helyét, amelyek fontosak a receptor kötődésben. Ennek elérésére az érett hIL-3-al szembeni monoklonális antitesteket hoztunk létre. Ezt követően ezeket az antitesteket alkalmaztuk a mutáns fehérjével szemben a "western blotting" kísérletekben. Legalább egy antigén fragmentumot lehetett kimutatni.

A jelen találmány szerinti új hIL-3 mutánsokat szókásos egy helyre irányuló mutagenézissel állítottuk elő, de számos más, a szakterületen ismert technikát lehet alkalmazni a módosított fehérjék előállítására.

Megfelelő vektorokat, amelyek képesek a kívánt hIL-3 mutánsokat kódoló mutáns DNS szekvenciák kifejezésére alkalmas mikroorganizmusokat transzformálni, beleértve az érett hIL-3-at kódoló szekvenciából származó adott mutációkat magukban foglaló expressziós vektorokat, összekapcsoltuk az expressziót szabályzó és a terminátor régiókkal. Ezeket a régiókat attól függően választottuk ki, hogy gazdasejtként prokariota vagy eukariota sejteket alkalmazunk-e. Előnyös gazda törzsként *E.coli*-t vagy *Bacillus*-t alkalmazni. Azonban gombák, élesztő sejtek és szövet teényszeti sejtek is alkalmazhatók (lásd. EP-A-0275598).

Az *E.coli* esetében alkalmazott expressziós vektorok magukban foglalják a pGB/IL-336-ot és a pGB/IL-339-et, amelyek

mindegyike tartalmazza a lacZ promotert, és Bacillus esetében a pGB/IL-322-t, amely tartalmazza az α -amiláz promotert és szignál peptidet, valamint ezek származékait. Ezeket és más vektorokat leírják az EP-A-0275598 és EP-A-90200624 szabadalmi bejelentésekben [bejelentve 1990. március 5-én a következő prioritások alapján: EP-A 89200660 (bejelentve 1989. márc. 15-én) és EP-A 89201967 (bejelentve 1989. július 25-én)].

Előnyőség szempontjából alkalmazhatóak olyan kifejező konstrukciók, amelyek a fehérjét a gazdasejten kívülre szekretálják. Például ez történik a Bacillus konstrukciók alkalmazása esetében. A sejten belüli anyag izolálása, így például az E. coli esetében, szintén lehetséges.

Az expresszió után kapott polipeptid tisztítása a gazdasejttől és az alkalmazott expressziós konstrukciótól függ. Általában a hIL-3 muteinek tisztítása a nativ hIL-3 tisztításával azonos módon történhet. A nagytisztaságú muteinek előállítására a következő lépéseket alkalmazzuk: hidrofob kölcsönhatáson alapuló kromatografálás, majd anioncserélő kromatografálás és adott esetben gélszűrés. Elegendő lehet ezen tisztítási lépések közül egyet vagy kettőt alkalmazni [a hIL-3 tisztításának a részletes leírását az EP-A 90200624 (bejelentve 1990. márc. 15.) adja meg, amely a következő prioritásokon alapszik: EP-A 89200660 (bejelentve 1989. márc. 15-én) és EP-A 89201967.0 (bejelentve 1989. július 25-én)].

Vázlatosan ismertetve, az *E. coliban* történő kifejezés után első lépésként elkülönítjük a fehérjét tartalmazó sejteket. Utána 8 mólos karbamid-oldatban ultrahanggal kezeljük, majd a fehérjét anioncserélő kromatografálással tovább tisztítjuk. A karbamid eltávolítása után a szűréssel történő sterilizálás olyan fehérjét eredményez, amelyet közvetlenül használunk fel a biológiai és biokémiai tulajdonságok meghatározására.

Gazdasejtként *Bacillust* alkalmazva, ami a polipeptidok szekrécióját is jelenti, hidrofob kölcsönhatáson alapuló és anioncserélő kromatografálás után nagytisztaságú polipeptideket kaptunk. Nyilvánvaló, hogy megváltozott töltésű mutánsok eltérő fizikai tulajdonságokkal rendelkezhetnek, ami speciális eluciós körülményeket vagy más oszlop tölteteket igényel, mint a példákban specifikusan alkalmazottak.

A tisztított muteineket gyógyszerkészítményként lehet formulálni egy gyógyászati szempontból elfogadott nem toxikus vivőanyaggal. Amint a fentiekben említettük, az ilyen készítményeket parenterális (szubkután, intramuszkuláris vagy intravénás) alkalmazás céljára lehet készíteni oldat vagy szuszpenzió formájában.

A készítmények alkalmazhatók egység dózisként ki-szerelt formában, és készíthetők a gyógyszer technológiában ismert bármely más módon is, például amint azt a Remington's Pharmaceutical Sciences-ben leírják (Mack Publishing Company,

Easton, Pa., 1970). A paranterálisan alkalmazható formák gyakori vivőanyaga a steril víz vagy sóoldat, polialkil-lénglikolok, mint például a polietilénglikol, növényi eredetű olajok, hidrogénezett naftalinok és hasonlóak.

A találmány szerinti anyagok alkalmazhatók egy gyógyszerben egyedüli hatóanyagként vagy más hatóanyaggal kombinálva is. Az egyéb hatóanyagokat például a következők-ből választhatjuk ki: hematopoietinek, CSF-ek és interleukinek. Ezek a következőket tartalmazzák: GM-CSF, CSF-1, G-CSF, M-CSF, eritropoietin, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4-től IL-8-ig és tumor nekrozis faktor.

Számos teszt áll rendelkezésre a találmány szerinti hIL-3 analógok biológiai aktivitásának és képességének a vizsgálatára. Például az analógokat a szakterületen jól ismert technikákkal meg lehet vizsgálni annak megállapítására, hogy az a fehérje stimulálja-e a humán hematopoietikus őssejtek telep képződését. A képződött telepek magukban eritroidok, granulociták és granulocita makrofágok. Alternatív módon az aktivitás megállapítása céljából meg lehet vizsgálni a szóbanforgó analógok azon képességét, hogy stimulálják-e a humán akut mielogén leukémia (AML) blasztok DNS szintézisét, ami például a jelzett timidin felvételével állapítható meg.

A humán IL-3 jelen találmányban megadott biológiai-
lag aktiv polipeptid analógjait terápiás és diagnosztikai
célra is fel lehet használni. A terápiás felhasználás magában
foglalja rosszindulatu és nem rosszindulatu betegségek keze-
lését és megelőzését.

A megadott mutánsok speciális tulajdonságainak kö-
szönhetően az alkalmazás fejleszthető.

A felhasználás a következő betegségek kezelését fog-
lalja magában:

- fertőzés okozta citopénia és/vagy immunszuppresszió;
- kemoterápiás és/vagy besugárzás hatására fellépő ci-
topénia;
- csontbetegségek, mint a csonttörések és osteoporozis;
- immunhiányosságok, amelyek általános anesztéziás ke-
zelések következményei;
- csontvelő transzplantáció utáni felépülés;
- vakcináció segítő anyagként és fertőzések adjuváns
terápiája.

A találmányt a következő, nem korlátozó példák
még bővebben bemutatják.

1. példa

Expressziós vektorok szerkesztése

Az érett humán IL-3-hoz közel álló polipeptid elő-
állítás céljából egy olyan szerkezetet készítettünk, amelyből

hiányoznak az 5'-nem transzlatált és a szignál peptidet kódoló szekvenciák. A pLH1 IL-3 cDNS inszertumát (lásd EP-A 0275598) HincII-vel és HindIII-mal hasítottuk, egy, az érett IL-3 14 N-terminális aminosavát kódoló szekvenciát tartalmazó szintetikus oligonukleotidhoz (SalI-kinyuló/tompa, 419/420, 1. táblázat) ligáltuk és SalI-HindIII-mal emésztett pTZ18R-be (Pharmacia) inszertáltuk. A szerkezet helyességének a bizonyítása után a teljes inszertumot átvittük pUC8-ba a fehérje termelés céljából (amint azt leírták az EP-A 0275598-ban), így ez a pGB/IL-335-öt eredményezte. A közvetlen szekvencia kialakulása és a mutagenézis lehetővé tétele céljából a replikáció f1-origóját tartalmazó pTZ18R plazmid pVul fragmentumával helyettesítettük a pUC8 megfelelő pvul fragmentumát. Az ennek eredményeképpen keletkező pGB/IL-336 bakteriális expressziós plazmid segítségével keletkezett a 145 aminosavból álló fúziós fehérje, amelynek a számított molekulásúlya 16384 dalton (1. ábra).

A pGB/IL-339 szerkesztése

Egy másik expressziós plazmidot szerkesztettünk, hogy megkönnyítsük a potenciálisan érdekességgel bíró mutások *Bacillus* expressziós vektorokba (lásd alább) való átvitelét. Ebből a célból pGB/IL-336-ot emésztettünk HpaI-gyel és HindIII-mal, hogy eltávolítsuk az IL-3 cDNS 3'-terminális régiójának a nagyobb részét. A kilógó végeket tompává tettük és ezt követően a megfelelő IL-3 szekvenciákat (nt 137-497)

tartalmazó tompa végű fragmentumot és a pGB/IL-337-ből származó B. licheniformis α -amiláz terminátort hozzá ligáltuk, amely a pGB/IL-338 plazmidot eredményezte. A pGB/IL-337-et pGB/IL-324-ből szerkesztettük (amelyet a 89201 9670 számú európai szabadalmi bejelentésben írnak le, mely közleményt itt referenciaként használunk fel) az IL-3 cDNS 3'-nem kódoló és az α -amiláz strukturális szekvenciák hurok képzésével ("looping-out") egy szintetikus oligonukleotid segítségével (1. táblázat, 944) a cDNS-ben lévő IL-3 stopkodon és az α -amiláz terminátor között. Ez az oligonukleotid bevitt egy XhoI helyet az IL-3 stopkodontól közvetlenül lefelé (downstream). A pGB/IL-338 plazmidot BamHI-gyel és HincII-vel emésztettük és a polilinker részt és az IL-3 szekvencia 5'-terminális részét a foszforilált 1055/1056 szintetikus oligonukleotidokkal helyettesítettük (1. táblázat), így előállítva a pGB/IL-339 plazmidot. Így az IL-3 gént egy kiemértékben heterológ szignál peptidet kódoló szekvenciával újra szerkesztettük. Ezután egy 148 aminosavat tartalmazó fúziós fehérjét szintetizáltunk, amelynek a számított molekulasúlya 16541 dalton (2. ábra). A pGB/IL-339 DNS szekvenciáját megvizsgáltuk, és azt helyesnek találtuk. A kifejezett fúziós fehérje biológiai aktivitását változatlannak találtuk.

Egy másik, E. coli expressziós vektort szerkesztettünk, a pGB/IL-340-et, amelyben a lacZ promotert közvetlenül

követik az érett IL-3-hoz pontosan kapcsolódó Bacillus α -amiláz szignál peptidet kódoló szekvenciák, az amiláz terminátort ezektől lefelé (downstream) tartalmazva. Ezt a plazmidot, amely a Bacillus expressziós vektorok szerkesztésének a közbelső termékeként is szolgál, úgy szerkesztettük, hogy a fent említett összes szekvenciát tartalmazó, a pGB/IL-337-ből származó NdeI-KpnI-gyel hasított E. coli pTZ18RN vektorba bevittük. A pTZ18RN a pTZ18R-nek (Pharmacia) olyan módosított változata, amelybe a lacZ ATG startkodontól felfelé (upstream) egy NdeI helyet vittünk be a 731 oligonukleotid felhasználásával (lásd az 1. táblázatot). A pGB/IL-340 az E. coliban az IL-3 magas hozamu termelését eredményezi.

2. példa

Deléció és szubsztitúció mutánsok szerkesztése

Az in vitro mutagenézist szintetikus oligonukleotidok alkalmazásával (1. és 2. táblázat) végeztük a Kunkel és mtsai által kidolgozott módszerrel [Meth. Enzymol., 154, 367-382 (1987)]. Az egyszálas DNS templátot a pGB/IL-336 vagy a pGB/IL-339 DNS CH236 E. coli törzsbe (BioRad) való transzformálásával és M13K07 helper fággal (Pharmacia) való szuperinfekcióval állítottuk elő. A fág DNS-t standard eljárásokkal állítottuk elő, és 0,6 %-os alacsony olvadáspontu agarózon frakcionáltuk a helper fág ssDNS eltávolítása céljából. A kivágott sávot megolvasztottuk és fenollel extraháltuk. A pGB/IL-336 vagy a pGB/

IL-336 vagy a pGB/IL-339 ssDNS visszanyerését butanolos koncentrációval és etanolos kicsapással végeztük, és primer-dependens DNS szintézisre teszteltük egy következő reakcióban.

A tisztított pGB/IL-336 vagy a pGB/IL-339 ssDNS-t (± 100 ng) 20 ng foszforilált primérral 65°C -on megfűtöttük, és lassan lehűtöttük szobahőmérsékletre. A komplementer szál szintézisét 1-2 μg 32 fehérje gén, 4 egység T4-DNS polimeráz és 2,5 egység T4-DNS ligáz felhasználásával végeztük. A reakciót 0°C -on 5 percen át, majd 20°C -on 10 percig és végül 37°C -on 90 percig végeztük. A befejezés után a reakcióelegy egyharmadát felengetett JM109 sejtekkel [Hanahan, D.: "DNA Cloning", (D.M. Glover kiad.), 1. kötet, 1985, IRL Press, Washington] kevertük össze, és lemezsre terítettük. Egyedileg kiemelt telepeket használtunk a folyékony táptalaj beoltására és a sejteket M13K07 helper féggel szuperinfektáltuk az ssDNS előállítás céljából. A klónok szekvenciáját a M13 reverz szekvenáló primer és két IL-3 szekvencia specifikus primer felhasználásával igazoltuk (1. táblázat, 823 : nt 118-137 és 824 : nt 261-280).

A kettős cisztein mutánst (9045) úgy szerkesztettük, hogy a 904 és 905 mutáns IL-3 géneket tartalmazó plazmidok megfelelő BstBI-BamHI fragmentumait ligáltuk. Hasonló módon az X és Z kombinációs mutánsokat egy 5'-deléciókat tartalmazó fragmentumok és 3'-deléciókat tartalmazó fragmentumok ligálásával szerkesztettük. A keletkező klónokat restrikciós enzimes analízis-

sel és szekvencia analízissel vizsgáltuk.

A 9329 mutáns a 939-ből származik HpaI és BamHI emésztés és 1424/1425 oligonukleotidokkal való ligálás után. A klónokat először a HpaI hely hiánya alapján, majd a korrekt DNS szekvencia alapján azonosítottuk.

Minden transzformátumból izoláltuk a plazmid DNS-t egy második, JM109 sejtekbe való transzformálás céljára, hogy kizárjuk az eredeti IL-3 szerkezettel történő lehetséges szennyeződést. A szekvencia igazolását követően ezeket a klónokat használtuk a fehérje termelésre.

Néhány itt leírt mutánst (811, 933 és 9329) bevittünk a pGB/IL-340-be. Ezt egy pGB/IL-339 eredetű mutáns PstI-XhoI fragmentum PstI-XhoI-lyel hasított pGB/IL-340-be való ligálásával végeztük, amely a pGB/IL-340/811, pGB/IL-340/933 és a pGB/IL-340/9329 plazmidokat eredményezte.

IL-3 muteineket kifejező Bacillus expressziós vektorokat szerkesztettünk a pGB/IL-322 PstI-HindIII fragmentumát (amely az alfa-amiláz szignál peptidet, a teljes érett IL-3 cDNS szekvenciát és az amiláz terminátort tartalmazza) kicserélve egy pGB/IL-340 mutáns származék PstI-HindIII fragmentummal (amely az α -amiláz szignál peptid egy részét, a mutáns IL-3 cDNS szekvenciát és az α -amiláz terminátort tartalmazza). A 811, 933 és 9329 muteinek Bacillus expressziós vektorait pGB/IL-322/811, pGB/IL-322/933 illetve pGB/IL-322/9329 névvel láttuk el.

Egy másik mutánst (1455, amelyből hiányoznak a 130-133 aminosavak) szerkesztettünk közvetlenül a pGB/IL-340 segítségével hurok-képzéses (loop-out) mutagenézissel, az 1455 oligonukleotid felhasználásával (1. táblázat), amely a pGB/IL-340/1455 plazmidot eredményezte. Ezt követően a mutáns szekvenciát átvittük pGB/IL-322-be a 811, 933 és 9329 mutánsoknál leírtakhoz hasonló módon, így előállítva a pGB/IL-341 plazmidot.

1. Táblázat

Mutagenézisnél felhasznált oligonukleotidok

Kód	Szekvencia (5'→3')	Résztvevő aminosavak
810	AACTGCTCTAACATGCCTTTGCCTTTGCTG	20-30
811	CACTTAAAGCAGCCAGAAAATAACCTTCGA	31-49
812	ATGGAAAATAACCTTAACAGGGCTGTCAAG	54-61
813	TTCAACAGGGCTGTCTCCTGCCATGTCTG	66-80
820	AATCTCCTGCCATGTGCACCCACGCGACAT	85-90
821	ACGGCCGCACCCACGGACTGGAATGAATTC	94-102
822	GGTGAAGTGAATGAAAATGCGCAGGCTCAA	107-119
932	CGGGGATCCGTCGACAACTGCTCTAACATG	1-14
933	ATAACACACTTAAAGAACACCTCAATGGG	29-37
934	GGGGAAGACCAAGACAGGCCAAACCTGGAG	47-54
935	AGGCCAAACCTGGAGGCATCAGCAATTGAG	60-70
936	GCATCAGCAATTGAGTGTCTGCCCCCTGGCC	76-83
937	TGTCTGCCCCCTGGCCCCAATCCATATCAAG	89-95
938	CATATCAAGGACGGTACGTTCTATCTGAAA	103-111
939	CTGAAAACCCTTGAGGCGATCTTTTGAGTC	120-130

823 CCTTGAAGACAAGCTGGGTT
 824 CCAAACCTGGAGGCATTCAA
 419 TCGACGCTCCCATGACCCAGACAACGCCCTTGAAGACAAGCTGGGTT
 420 AACCAGCTTGTCTTCAAGGGCGTTGTCTGGGTCATGGGAGCG
 731 CAGGAAACACATATGACCATGATT
 944 TGAGCCTCGGATCTTTTGAAGTAGAAGAGCAGAGAGGACGG
 1055 GATCCTCTGCAGCAGCGGCGCTCCCATGACCCAGACAACGCCCTTGAAG-
 ACAAGCTGGGTT
 1056 AACCAGCTTGTCTTCAAGGGCGTTGTCTGGGTCATGGGAGCCGCCGCTG-
 CTGCAGAG
 1424 GATCCTCTGCAGCAGCGGCG
 1425 CGCCGCTGCTGCAGAG
 1455 CTCAACAGACGACTTTGAGCTGACTCGAGTAGAAGAGCAGAG

• az IL-3 génben a delécio mellettí nukleotidot jelzi

2. Táblázat

Szubsztitúciós mutagenézisben résztvevő oligonukleotidok

Kód	Szekvencia (5'→3')	Résztvevő aminosavak
904	GACAAGCTGGGTTAACGCTAGCAACATGATCGATGAA	16
905	CTTAAAAATCTCCTGCCGGCGCTGCCCCCTGGCCACGG	84
1480	TTGCCTTTGCTGCGCTTCAACAACCTC	36
1481	AACCTCAATGGGAAACGCCAAGACATTCTG	43-44
1482	GGGGAAGACCAACGCATTCTGATGGAA	46
1483	GACATTCTGATGAAAAATAACCTTCGA	50
1484	GAAAAATAACCTTGAAGATCCAAACCTGGAG	54-55
1485	AGGCCAAACCTGAAAGCATTCAACAGG	59
1486	GAGGCATTCAACCCGGGCGTCAAGAGTTTA	63-64
1487	GCATCAGCAATT[C/G]GTAGCATTCTTAAA	75
1488	GAGAGCATTCTTGAAAATCTCCTGCCA	79
1489	GCCGCACCCACGCCGCATCCAATCCAT	94
1490	CGACATCCAATCGAAATCGATCAGGGTGAAGTGAAT	98-101
1491	GGTGAAGTGAATAAATTCCGGAGGAAA	106
1492	TGGAATGAATTCTGAAGATGAACTGACGTTCTAT	108-110
1493	AGGAAACTGACGGCGACCCTGAAAACCTT	113-114

3. példa

E. coliból vagy Bacillusból származó IL-3
muteinek tisztítása

JM109 E. coli tenyészeteket (100 ml) beoltot-
tunk a (mutáns) IL-3 klón egy friss, éjszakán át növesztett
tenyészetének 0,5 ml-ével és 37 °C-on szaporítottuk mind-
addig, míg az OD érték 550 nm-en mérve 0,4-0,6 nem lett.
A plazmid által irányított fehérjeszintézist 1 nmól IPTG
[izopropil-β-D-tiogalaktopiranozid; (Pharmacia)] hozzáadá-
sával indukáltuk. További 3-16 órás tenyésztés után a sej-
teket centrifugálással (10 perc, 4000 rpm 4 °C-on) össze-
gyűjtöttük, és fagyasztva tároltuk.

A baktériumokat 10 ml TE-ben (10 mM Tris-HCl,
pH=8, 1 mM EDTA) szuszpendáltuk és lizozimet adtunk hozzá
(0,025 % = 500 µg/ml). Szobahőmérsékleten 30 percig tartó
inkubálást követően MgCl₂-t és DNázt adtunk hozzá 10 mM,
ill. 20 µg/ml végső koncentrációig. Miután 37 °C-on 15 per-
cig inkubáltuk, Tween 20-at (0,2 %), DTT-t (2 mM) és PMSF-et
(phenyl-methyl-szulfonil-fluorid, továbbiakban PMSF) (0,1
mM) adtunk hozzá. A szuszpenziót jégben lehűtöttük és erőlyes
ultrahang kezelésnek vetettük alá (kétszer 35 másodperc).
A homogenizátumot centrifugálással (30 perc, 15 000 x g,
10 000 rpm, Beckman JS13.1 rotor) tisztítottuk 4 °C-on és
a felüluszt eldobtuk.

Az üledéket 4 ml 55 % szacharózt tartalmazó
pufferolt TPD-ben (50 mM Tris-HCl, pH=8, 0,1 mM PMSF és

2 mM DTT) ultrahangos kezeléssel felszuszpendáltuk és vagy kicsaptuk és karbamid oldatban oldottuk a biológiai aktivitás közvetlen mérésére, vagy szakaszos szacharóz gradiens-re rétegeztük (75 és 60 %-os szacharóz-oldat TPD pufferban, 2 ml-es adagok), lényegében a WO 88/00598-ban leírtak szerint, 200 000 g-nél 25 °C-on 2 órán át történő centrifugálás (35 000 ford/perc, Sorvall TH641 rotor) után az IL-3 fehérjét tartalmazó testeket a 75 %-os szacharózos interfázisból kinyertük.

Legalább négyezeres higitás után a hatóanyagot tartalmazó testeket 25 000 g-vel ülepitettük (30 perc, 13 000 ford/perc, Beckman JS13.1 rotor) és 50 mM Tris-HCl-t (pH=8,9) és 2 mM DTT-t tartalmazó 8 mólos karbamid-oldat 5 ml-ében ultrahanggal kezeltük, és éjjelen át 4 °C-on állni hagytuk. A feltisztult oldatot ezt követően felvittük egy 3 ml-es DEAE-Sapharose Fast Flow oszlopra (Pharmacia), amelyet kiegyensúlyoztunk 8 M karbamidot, 50 mM Tris-HCl-t (pH=8,9) és 1 mM DTT-t tartalmazó pufferrel. Az IL-3 fehérje az oszlophoz kötődött, és fokozatosan eluáltuk 75 mM NaCl-t tartalmazó ugyanezen pufferrel. Az eluált fehérjét többször ismételve dializáltuk 10 mM Tris-HCl-t (pH=8,0) és 1 mM DTT-t tartalmazó pufferrel szemben, majd izotóniássá tettük 1 % marha szérum albumint tartalmazó tízszeresére koncentrált RPMI sejt tenyésztési táptalajt (Sigma) adva hozzá. A szűrővel sterilizált (0,22 µm Millex-GV, Millipor) oldatot használtunk biológiai és biokémiai jellemzésre.

A *Bacillus* által termelt 811, 933, 1455, 9329, X és Z mutáns fehérjék a táptalajba választódnak ki, és nem igényelnek ilyen drasztikus tisztítási eljárásokat a biológiai aktivitás tesztelése előtt. Ezért a tükrösen tiszta felülszót (1 liter) (amelyet 5 mM EDTA, 1 mM PMSF és 1 M ammónium-szulfát összetételűre beállítottunk) átnyomattuk egy 15-20 ml-es Fractogél TSK Butyl 650 (C) oszlopon (Merck), amelyre 1M ammónium-szulfátot tartalmazó 10 mM-os Tris-HCl (pH=7) pufferral egyensúlyoztuk ki. A megkötött IL-3 fehérjét 10 mmólos Tris-HCl pufferral eluáltuk, és ezt követően egy 1,5 ml-es DEAE-Sepharose Fast Flow oszlopon engedték át, amelyet előzőleg kiegyensúlyoztuk 10 mmólos Tris-HCl (pH=8) pufferral. Az átfolyt oldatot összegyűjtöttük, és 70 %-os ammónium-szulfát töménységűre állítottuk az IL-3 fehérje koncentrációja céljából. A csapadékot 10 000 ford/perc-cel centrifugálva (JS-13 rotor) összegyűjtöttük, oldottuk és 1 mM DTT-t tartalmazó 10 mmólos Tris-HCl (pH=8) pufferral szemben dializáltuk.

Az eredeti baktérium tenyészet 25-100 μ l-ének megfelelő mennyiségű mintákat 0,75 x 75 x 100 mm-es (BioRad mini-protean II) SDS-poliakrilamid gélen (akril/biszakril = 29/1) analizáltuk. A fehérjéket Coomassie Brilliant Blue G250 festéssel vagy immunológiai módszerekkel tettük láthatóvá. A 4. ábra mutatja az *E. coli* által kifejezett tisztított muteinek egy példáját. A mutáns pGB/IL-339 származék IL-3 fehérje expressziója az *E. coli*-ban általában nagyobb mértékű, mint

ugyanennek a mutáns fehérjének az expressziója a pGB/IL-336 expressziós vektorral. Az alkalmazott tisztítási lépéseket nem úgy választottuk ki, hogy teljesen tiszta IL-3 fehérje készítményeket nyerjünk. Általában kevés nagyobb molekulásulyu szennyező anyagot találtunk az SDS géleken. A megfestett SDS gélek denzitometriás vizsgálatával határoztuk meg az IL-3 fehérje mennyiségét. Bár néha a dialízis után nagy fehérje-vesztéssel tapasztaltunk, a kinyert "tisztított" IL-3 fehérjének általában a teljes mennyisége 0,1-1 mg volt. Csak a 811 és 933 mutánsok képeztek kivételt, amelyek nem adtak fúziós fehérje terméket az *E. coli* expressziós vektorok egyikének esetében sem. A "Northern" analízis szerint a baktériumokban erősen csökkent az IL-3 specifikus RNS, míg nem volt megfigyelhető különbség a plazmid DNS tartalomban. Ennek az eredménynek az alapján feltételezhető, hogy valószínűleg csökkent az mRNS stabilitás az eukarióta IL-3 cDNS szekvenciában végrehajtott deléciók következtében.

A 811 és 933 muteinek szintézisének egyetlen megfelelő módszere a *Bacillus licheniformis*-ban történő expresszió. Bár a termelt fehérje mennyisége igen alacsony összehasonlítva más muteinokkal, így 9329-et és 1455-t szintetizáló *Bacillus* törzsek által termelt fehérjék mennyiségével szemben, mégis elegendőt készítettünk a 811 és 933 muteinek részleges tisztításához ahhoz, hogy elvégezzük velük az itt leírt

biológiai vizsgálatokat.

4. példa

Az IL-3 muteinek immunológiai jellemzése

A poliklonális és monoklonális antieszérumok készítését a WO 88/04691-ben írták le.

Az IL-3 muteinek immunológiai kimutatása céljából a gélen frakcionált fehérjéket (lásd 3. példa) nitrocellulózra vittük fel (0,2 μ m, Schleicher és Schüll BA83) a félig száraz "blotting" rendszert alkalmazva (Novoblat, Pharmacia /LKB/) egy folyamatos puffer rendszerrel (39 mM glicin, 48 mM Tris, 0,0375 % SDS és 20 % metanol) 1,2 mA/cm² áramerősséggel 90 percen át. Ezt követően a nitrocellulóz szűrőt levegőn megszárítottuk, 3 %-os marha szérum albumin (BSA, Sigma) oldattal [10 mM Tris-HCl (pH=7,6), 350 mM NaCl, 0,1 % PMSF és 0,1 % nátrium-azid] előinkubáltuk, és 4-16 órán át inkubáltuk humán IL-3-al szembeni poliklonális (10^{-3} higitás) vagy monoklonális (a tervezett kísérlet céljától függően) antitestekkel (MCA A1, A4, A5, A8, A18, 10^{-4} higitás) RIA pufferben [10 mM Tris-HCl (pH = 7,6), 150 mM NaCl, 1 % Triton- X-100, 0,1 % SDS, 0,5 % nátrium-dezoxikolát, 0,1 mM PMSF és 0,3 % BSA]. Az immunológiai komplexeket biotinilezett anti-nyúl vagy -egér Ig-vel, streptavidin-biotinilezett torna peroxidázzal (Amersham International, Amersham, UK) és 4-klór-1-naftollal (Gibco-BRL) tettük láthatóvá és gyártó cégek előírása szerint el-

járva. Alternatív módon az antiszérum inkubációkat Tris-el pufferolt sóoldatban végeztük, amely 0,05 % Tween 20-at tartalmazott. Az alkalikus foszfatázhoz kapcsolt anti-egér Ig komplexeket standard előírások szerint (Promega) tettük láthatóvá.

A specifikus monoklonális antitestek és a hIL-3 muteinek közötti "western blotting" kísérletekben létrejövő kölcsönhatásokra vonatkozó adatokat a 3. táblázat tartalmazza.

3. Táblázat

Az IL-3/MCA adatok kiértékelése

Mutáns (aminosav) MCA	4810 20-30	933 29-37	811 31-49	934 47-54	812 54-61	935 60-70	4813 66-80	Minden más
-----------------------------	---------------	--------------	--------------	--------------	--------------	--------------	---------------	---------------

A1	++	--	--	++	++	++	++	++
A4	++	++	++	++	+	+	+	++
A5	++	++	--	--	+	++	++	++
A8	++	++	--	++	++	++	++	++
A18	++	--	--	++	++	++	++	++
2	++	--	--	++	++	++	++	++
3	++	++	--	--	+	++	++	++
6	++	++	--	+	++	++	++	++
10	++	++	--	+	++	++	++	++
12	++	--	--	++	++	++	++	++
13	+	--	--	++	++	+	+	++
14	++	++	--	--	+	++	++	++
15	++	--	--	++	++	++	++	++
26	++	++	--	+	++	++	++	++
27	++	++	++	++	+	+	+	++
32	++	--	--	++	++	++	++	++
33	++	--	--	++	++	++	++	++

	36D->R 1480	43ED->KR 1481	46D->R 1482
A1	++	++	++
A4	++	++	++
A5	++	++	--
A8	++	--	+
A18	+	++	++

A : aszcites monoklonális antitestek
 ++: teljes válaszreakció a "western blot"-ban
 + : legalább ötödére csökkent válaszreakció
 --: nem volt megfigyelhető reakció

A 3. táblázatban bemutatott eredmények analíziséből nyilvánvaló, hogy a gélen tisztított denaturált fúziós fehérjével szemben kifejlesztett monoklonális antitestek nagy része az érett IL-3 polipeptid 30 és 50 csoportjai között elhelyezkedő epitopokkal szemben képződtek. Ezek az epitopok főleg lineáris polipeptid láncok, csak egy esetben azonosítottunk nem összefüggő epitopot (13). A legnagyobb csoport képes azonosítani a 933 mutánst, de nem reagál a 811 mutánssal. Így az epitopnak a 37 és 50 csoportok között kell elhelyezkednie. Ez a régió nagymértékben hidrofilnek bizonyult egy feltételezett β -csavarodással és α -hélix-szel (DNASIS software) és Hopp és Wood algoritmust alkalmazva feltételezetten antigén determináns. Az antitestek második csoportját jellemzi, hogy nem reagál a 933 mutánssal (amelyből hiányzik 9 aminosav). Erről a hidrofób, prolinban gazdag régióról nem feltételezett, hogy fő antigén hely legyen.

Ezen epitopok pontosabb lokalizációját az aszcites monoklonális antitesteknek a következő szubsztitúciók mutánssokkal adott reakciója alapján állapítottuk meg: $\text{Asp}^{36} \rightarrow \text{Arg}$, $\text{Glu}^{43} \text{Asp} \rightarrow \text{Lys}^{43} \text{Arg}$ és $\text{Asp}^{46} \rightarrow \text{Arg}$.

Az aszcites monoklonális antitestek kettős szendvics ELISA-val végzett további vizsgálata szerint nincs kölcsönhatás az A1 és A5 vagy A8 között, valamint az A5 és A18 között. A kompetíciós ELISA vizsgálat szerint kereszt-kompetíció van az A1 és A18 között, az A5 és A8 között, valamint az A8 és A18 között. Az A4 esetében nem tapasztaltunk kereszt-kompetí-

ciót. Ezek az adatok megegyeznek az "immun-blotting" kísérletek eredményeivel. Továbbá azt tapasztaltuk, hogy az aszcite antitestek reagálnak az emlős, bakteriális és élesztő tenyészetekből származó hIL-3 készítményekkel, tekintet nélkül a glikozilációs állapotukra.

Ezen immunológiai tesztekéből nyert információkból az epitopokat a következők szerint tudjuk lokalizálni.

- A1 és A18 a 29 és 37 aminosavak között elhelyezkedő epitoppal szemben hatásos. Továbbá a 36 D → R mutánsból le lehet vonni azt a következtetést, hogy az A18 epitop valamivel távolabb helyezkedik el a C-terminálisról, mint az A1 epitop.
- Az A5 a 45 és 54 aminosavak között elhelyezkedő epitoppal szemben hatásos.
- Az A8 a 36 és 47 aminosavak közötti epitoppal szemben hatásos.

5. példa

Az IL-3 muteinek biológiai jellemzések

Az AML DNS szintézist humán AML193 sejteken teszteltük. Humán AML193 sejteket (ATCC : CRL-9589) 10-20 egység humán IL-3-at tartalmazó szérum mentes közegben tartottuk (Serum Free Medium, továbbiakban SFM) [Iscove's modified Dulbecco's Medium (Gibco BRL), amely 0,1 % BSA-t (Beh-

ringwerke A.G. Marburg), 10 µg/ml inzulint (Organon) és transzferrint, valamint 0,1 mM β-merkaptó-etanolt tartalmazl.

A (mutáns) IL-3 készítmények higitásait (50 µl) kerek alju 96 vályatu lemezekben végeztük SFM-ben. Mosott sejteket ($1-2 \times 10^4$ 50 µl SFM-ben) adtunk hozzájuk, és 6 napon át tenyésztettük. Ezután ³H-timidint (0,1 µCi/mmól) adtunk 20 µl SFM-ban, és a sejteket 16 órával később összegyűjtöttük. Az IL-3 aktivitásának egysége az a mennyiség, amely ahhoz szükséges, hogy ezen kísérleti körülmények között a DNS szintézis maximumának az 50 %-át adja. A referencia IL-3 készítmények aktivitása 2×10^6 és 2×10^7 egység/mg fehérje között van. Általában a muteinek biológiai aktivitása összehasonlítható mértékű a referencia készítményével.

A 4. ábra az AML proliferáció vizsgálata egy példáját adja meg, amelyben a 812 muteint hasonlítottuk össze a Bacillus által kifejezett referencia IL-3-mal. A rajz mutatja, hogy a 812 mutein aktivitása közel négy nagyságrenddel csökkent a nem módosított IL-3-hoz viszonyítva. Azonban a mutein még mindig képes stimulálni az AML sejteket a maximális aktivitásig, csak ehhez több fehérje szükséges.

IL-3 receptor kötődési vizsgálatot tisztított rekombináns hIL-3-mal végeztünk (lásd EP-A 0275598). Az IL-3-at radioaktívan jeleztük Bolton-Hunter reagenssel, és azt Budel és mtsai leírják, Blood 74, 565-571

(1989)1. Az IL-3 specifikus aktivitását 80 000 cpm/ng-nak mértük. Teszt anyagként vagy donor leukocitákat, beteg ANL sejtjeit vagy MVA-11 sejteket (ATCC : CRL-9591) alkalmaztunk. A sejteket Hanks Balanced Salt (Hank-féle kiegyensúlyozott sóoldat, továbbiakban HBS) oldattal mostuk és 1 % BSA-t tartalmazó Alpha MEM oldatban felfuszpendáltuk. Rendszerint $3-10 \times 10^6$ sejtet inkubáltunk 200-300 pM radioaktívan jelzett IL-3-al és különböző koncentrációjú nem jelzett mutáns fehérjével 200 μ l össz-térfogatban 1 órán át 37 °C-on. A sejthez kötött jelzett IL-3-at 10 percig 1000 g-nél 4 °C-on centrifugáltuk egy 0,5 ml borjúk szérum rétegen keresztül Eppendorf csőben (Budel és mtsai: 1989). A csöveket folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, a végeket levágtuk, és Packard gamma-számlálóban mértük a radioaktivitást. A kompetíciós kötődést a referencia készítményhez viszonyítva határoztuk meg. Az 5. ábra egy IL-3 receptor kötődési kísérlet példát mutat be. Radioaktív jelzéssel ellátott IL-3 beteg ANL blasztjaihoz való kötődése kompetícióban van a nem jelzett IL-3 fehérjével (referencia készítmény). A cél-sejtekben lévő receptorok kis számának a következtében (kevesebb mint 200) a kompetíció adatai sokszor egy nagyságrenddel is változnak.

A specifikus deléció és szubsztitúciós mutánsokkal kapcsolatos fenti vizsgálatok eredményeit a 4. táblázat mutatja be. Az eredmények egy részét a 6. ábrában grafikusán is bemutatjuk.

Amint látható, a pGB/IL-336 vagy a pGB/IL-339 expressziós plazmidokból származó IL-3 fúziós fehérjék biológiai aktivitása azonos és nem térnek el szignifikánsan a B. licheniformis referencia készítményétől, amely a pGB/IL-322-ben lévő teljes hosszúságú IL-3 cDNS expressziójából származik (lásd EP-A 89201967.0). Nyilvánvaló, hogy az E.coli fúziós fehérjékben a heterológ vezér-peptid nem fejt ki negatív hatást a biológiai aktivitásra. A legtöbb IL-3 deléziós mutáns biológiai aktivitása szignifikánsan csökkent. Az 50 és 105 aminosavak közötti deléciók a specifikus aktivitásnak több mint 10 000-szeres csökkenését idézik elő. Azonban minden esetben kimutattunk maradék biológiai aktivitást, amely jelzi a biológiai vizsgálat érzékenységét és azt, hogy a fehérje készítmények nem tartalmaznak toxikus anyagokat. A biológiai aktivitás teljes megtartását figyeltük meg a 932 (1-14) és a 939 (120-130) deléziós mutánsokban és a megfelelő 9329 kettős mutáns esetében, valamint a C-terminális 1455 mutáns esetében. A deletált N- és C-terminális szekvenciák nyilvánvalóan nem vesznek részt a receptorhoz való kötődésben vagy a molekula sajátos feltekeredésében. Ezzel ellentétben a cisztein csoportok egyetlen szubsztitúciója (904 és 905 mutánsok) a biológiai aktivitás 5000-szeres csökkenését eredményezi. Hasonló hatások tapasztalhatóak a kettős cisztein mutáns esetében (9045), jelezvén, hogy az S-S hid fontos stabilizáló szerepet játszik a natív IL-3 molekulában.

A fenti fejezetben leírt, E. coliban kifejezett muteinek mind fúziós fehérjék. Annak bizonyítására, hogy az extra N-terminális aminosavak nem szükségesek a deletált IL-3 specifikus aminosavak kompenzálásához, pGB/IL-322/9392 szerkezetet készítettünk, és B. lichenoformisban kifejeztük azt. Ez a szerkezet egy 1-14/120-130 IL-3 mutein képződést eredményez anélkül, hogy az az N-terminálison külön aminosavakat tartalmazna. Ennek a muteinnek az aktivitása összehasonlítható mértékű a vad-típusu molekuláéval, bizonyítva, hogy csak a maradék 108 aminosav felelős az IL-3 aktivitásáért.

A legtöbb mutáns IL-3 fehérje receptor kötődését meghatároztuk. A kötődési kísérletek nem teszik lehetővé a részletes összehasonlítást, ami a cél-sejteken lévő alacsony receptor számnak tulajdonítható. Azonban általában jó összefüggés van a biológiai aktivitás és a receptor kötődés között (4. táblázat). A legtöbb mutáns IL-3 fehérje esetében a relatív kötődés és biológiai aktivitás közötti arány közelítőleg 1. Az 1483, 1480, 904 és 9045 muteinek jelentősen nagyobb arányt mutatnak (4. táblázat és 6. ábra), jelezvén a potenciális antagonistáktá válást. Ez azt jelenti, hogy ezeket a molekulákat az IL-3 részleges antagonistájaként lehet tekinteni. További kísérleti muteineknél azt tapasztalhatjuk, hogy azonos kötődési kapacitásuk, mint a natív IL-3, de 10^4 -szer alacsonyabb az aktivitásuk. Ezek a molekulák az IL-3 valódi

antagonistái. A jelen találmányban leírt megoldás ilyen molekulák előállításának az eszközeit és módszereit adja meg.

4. táblázat

Az IL-3 mutánsok biológiai aktivitása

Mutáns kód	Aminosav delé- ció vagy szubsztitúció 1/	Relatív specifikus biológiai aktivitás 2/	Relatív antagonista képesség 3/
Referencia		1.0	
pGB/IL-339		3.7×10^{-1}	
pGB/IL-336		7.9×10^{-1}	1.1 (0.2-3.3)
932	1-14	7.1×10^{-1}	2.8 (0.6-4.9)
810	20-30	2.1×10^{-3}	2.4
934	47-54	7.3×10^{-5}	N.C.
812	54-61	5.3×10^{-5}	1.2 (0.9-1.4)
935	60-70	1.2×10^{-5}	N.C.
813	66-80	2.4×10^{-5}	N.C.
936	76-83	6.4×10^{-6}	N.C.
820	85-90	1.1×10^{-5}	N.C.
937	89-95	1.0×10^{-5}	N.C.
821	94-102	1.8×10^{-5}	N.C.
938	103-111	6.6×10^{-5}	N.C.
822	107-119	2.1×10^{-4}	1.9 (0.6-3.9)
939	120-130	2.0	1.8 (0.3-2.8)
9329	1-14/120-130	4.0×10^{-1}	2.0 (1.8-2.1)
904	16C-->A	2.4×10^{-4}	100 (33-210)
905	84C-->A	1.9×10^{-4}	11 (4.8-38)
9045	16/84C-->A	3.1×10^{-4}	88 (13-170)
1480*	36D-->R	3.1×10^{-3}	12
1481	43ED-->KR	$<1.5 \times 10^{-4}$	N.C.
1482*	46D-->R	7.5×10^{-3}	0.6
1483	50E-->K	2.7×10^{-3}	37 (4-67)
1484	54RR-->ED	8.0×10^{-5}	3.5 (2.3-4.7)
1485*	59E-->K	1.1×10^{-2}	3
1486	63RA-->PG	9.8×10^{-5}	14 (3.5-27)
1487A*	75E-->G	1.5×10^{-2}	3
1487B*	75E-->R	8.6×10^{-3}	3
1488	79K-->E	1.9×10^{-3}	65 (54-77)
1489	94R-->P	1.7×10^{-3}	N.C.
1490*	98HIKD-->EIKQ	2.2×10^{-3}	5
1491*	106E-->K	3.2×10^{-4}	6
1492	108RRK-->EDE	3.1×10^{-5}	2 (1.2-3)
1493	113FY-->AT	$<1.2 \times 10^{-5}$	N.C.
X#	1-14/120-133	2.3×10^{-1}	8.9 (3.6-14)
Z#	1-14/116-133	1.1×10^{-1}	1.6 (1-1.9)
933#	29-37	5.7×10^{-3}	1.1 (0.2-2.9)
811#	31-49	4.8×10^{-3}	1.6 (0.5-3.2)

A táblázat jelzéseinek magyarázata:

1. Az érett humán IL-3 aminosavainak a számmal jelölt helyei közötti deléciókat jeleztük.
2. Az átlag specifikus biológiai aktivitást a referencia IL-3 készítményekhez viszonyítva fejeztük ki.
3. Az antagonistá képeességet a relatív receptor kötő aktivitást a relatív biológiai aktivitással osztva adjuk meg. A határokat zárójelek között adjuk meg.
- * A hatóanyagot tartalmazó testeket szacharóz oldatból ülepitettük, és karbamid-oldatban oldottuk. A mutein-eket reakcióoldattal hígítottuk, és vizsgáltuk biológiai aktivitásukat. A receptor kötődési kísérleteket egy alkalommal végeztük el.
- ≠ A mutáns fehérjéket Bacillusban fejeztük ki, és ezek nem tartalmazzák a vezér polipeptid szekvenciát.
- § A mutein fehérje koncentráció túlságosan alacsony volt a denzitometriás méréshez, és a gélekből és "western blot"-okból határoztuk meg azokat.
- N.C. Nem volt megfigyelhető kompetíció a konkrét muteint készítményben.

A jelen leírásban említett minden közlemény (beleértve a szabadalmakat és a szabadalmi bejelentéseket) utmutatónak

tekintendő azon szakterületen jártas szakember számára, amely szakterülethez ezen találmány tartozik. Minden közleményt itt a hivatkozásokkal olyan mértékben adunk meg, amilyen mértékben minden egyes publikációt specifikusan és egyedileg jeleztünk a referenciákba foglalva.

Bár a fenti találmányt a megérthetőség világossá tétele céljából részletesen leírtuk az illusztrációkkal és példákkal, a terület szakembere számára nyilvánvaló, hogy változtatásokat és módosításokat lehet ezeken végrehajtani anélkül, hogy a mellékelte igénypontok szellemétől vagy tárgykörétől eltérnének.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. A humán interleukin-3 biológiaiilag aktiv analógja azzal j e l l e m e z v e , hogy az érett humán interleukin-3 molekulához képest legalább két aminosav deléciót tartalmaz, és tulajdonságai annál jobbak.

2. A humán interleukin-3-nak az 1. igénypontnak megfelelő biológiaiilag aktiv polipeptid analógja azzal jellemezve, hogy legalább 4 aminosav deléciót foglal magában.

3. A humán interleukin-3-nak az 1. vagy 2. igénypontok szerinti biológiaiilag aktiv polipeptid analógja azzal jellemezve, hogy 4 aminosav C-terminálison elhelyezkedő delécióját foglalja magában.

4. A humán interleukin-3 1. vagy 2. igénypontok szerinti biológiaiilag aktiv polipeptid analógja azzal jellemezve, hogy az N-terminálison 14 aminosavig terjedő és/vagy a C-terminálison 18 aminosavig terjedő deléciót foglal magában.

5. A humán interleukin-3 1. vagy 2. igénypontok szerinti biológiaiilag aktiv polipeptid analógja azzal jellemezve, hogy egy belső deléciót foglal magában.

6. A humán IL-3 biológiaiilag aktiv polipeptid analógja azzal jellemezve, hogy az alábbi szubsztitúciókból legalább egyet tartalmaz:

Asp ²¹ Glu ²²	→	Lys ²¹ Arg ²²
Asp ³⁶	→	Arg ³⁶
Glu ⁴³ Asp ⁴⁴	→	Lys ⁴³ Arg ⁴⁴
Arg ⁴⁵ Arg ⁵⁵	→	Glu ⁵⁴ Asp ⁵⁵
Asp ⁴⁶	→	Lys ⁴⁶ vagy Arg ⁴⁶
Glu ⁵⁰	→	Lys ⁵⁰ vagy Arg ⁵⁰
Glu ⁵⁹	→	Lys ⁵⁹ vagy Arg ⁵⁹
Glu ⁵⁹	→	Gly ⁵⁹ vagy Pro ⁵⁹
		(α-hélix megtörő)
Arg ⁶³ Ala ⁶⁴	→	Pro ⁶³ Gly ⁶⁴
Glu ⁷⁵	→	Arg ⁷⁵ vagy Gly ⁷⁵
Lys ⁷⁹	→	Glu ⁷⁹
Arg ⁹⁴	→	Pro ⁹⁴
His ⁹⁸ Lys ¹⁰⁰ Asp ¹⁰¹	→	Glu ⁹⁸ Asp ¹⁰⁰ Gln ¹⁰¹
Glu ¹⁰⁶	→	Lys ¹⁰⁶
Arg ¹⁰⁸ Arg ¹⁰⁹ Lys ¹¹⁰	→	Glu ¹⁰⁸ Asp ¹⁰⁹ Glu ¹¹⁰
Phe ¹¹³ Tyr ¹¹⁴	→	Ala ¹¹³ Thr ¹¹⁴
Cys ¹⁶	→	Ala ¹⁶
Cys ⁸⁴	→	Ala ⁸⁴
Cys ¹⁶ Cys ⁸⁴	→	Ala ¹⁶ Ala ⁸⁴ .

7. A hIL-3 biológiailag aktív analógja azzal jellemézve, hogy antagonistá hatásu.

8. A hIL-3 7. igénypont szerinti biológiaiilag aktiv polipeptid analógja azzal jellemezve, hogy azt a következő csoportban felsorolt mutációk valamelyikét tartalmazza:

$\text{Cys}^{16} \rightarrow \text{Ala}^{16}$, $\text{Cys}^{16}\text{Cys}^{84} \rightarrow \text{Ala}^{16}\text{Ala}^{84}$,
 $\text{Glu}^{50} \rightarrow \text{Lys}^{50}$, $\text{Lys}^{79} \rightarrow \text{Glu}^{79}$.

9. A humán IL-3 biológiaiilag aktiv polipeptid analógja azzal jellemezve, hogy mind deléciót mind szubsztituciót tartalmaz.

10. Gyógyszerkészítmény azzal jellemezve, hogy hatóanyagként a humán interleukin-3-nak az 1-9. igénypontok bármelyikének megfelelő biológiaiilag aktiv polipeptid analógját vagy annak egy származékát egy gyógyászatiilag elfogadott vivőanyaggal együtt tartalmazza.

11. A 10. igénypont szerinti gyógyszerkészítmény, azzal jellemezve, hogy az tartalmaz még egy, az alábbiakból álló csoportból választott anyagnak a gyógyászatiilag hatásos mennyiségét: GM-CSF, CSF-1, G-CSF, M-CSF, eritropoietin, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4-től IL-8-ig és tumor nekrosis faktor.

12. Egy DNS fragmentum azzal jellemezve, hogy az 1-9. igénypontok bármelyikének megfelelő polipeptidet kódoló DNS szekvenciát tartalmazza.

13. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet kódoló DNS szekvenciát tartalmazó klónozó hordozó azzal jellemezve, hogy olyan transzkripció és transzláció szabályzó szekvenciákkal van kombinálva, amelyek lehetővé teszik, az említett polipeptidek megfelelő gazdasejtekben való expresszióját.

14. Gazdasejt azzal jellemezve, hogy a 13. igénypont szerinti klónozó hordozóval van transzformálva.

15. Eljárás humán interleukin-3-nak az 1-9. igénypontok egyikének megfelelő biológiailag aktív polipeptid analógját kódoló DNS szekvencia előállítására, azzal jellemezve, hogy:

- az érett hIL-3 fehérjét kódoló DNS szekvenciát izoláljuk;
- in vitro mutagenézist hajtunk végre a kívánt nukleotidok deléciója vagy szubsztitúciója céljából.

16. Eljárás humán interleukin-3-nak az 1-9. igénypontok egyikének megfelelő biológiailag aktív polipeptid analógjának az előállítására azzal jellemezve, hogy

- az adott polipeptidet kódoló DNS szekvenciát beviszük egy expressziós vektorba oly módon, hogy az a megfelelő expressziót szabályzó szekvenciák kontrollja alatt legyen;
- az adott expressziós vektort beviszük egy megfelelő gazdasejtbe;

- a gazdaséjtet tenyésztjük;
- az adott gazdaséjtek által termelt fehérjét ki-
nyerjük.

17. Monoklonális antitest azzal jellemezve, hogy az érett humán IL-3 29 és 54 aminosavai között elhelyezkedő epitoppal szemben hatásos.

18. Eljárás az érett humán IL-3 29 és 54 aminosavai között elhelyezkedő epitoppal szemben hatásos monoklonális anti-
test előállítására.

56 oldal + 6 oldal A meghatalmazott
pt. H. L.

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETI ÜGYVÉDI
ÉS SZAKDOLGOZÓIRODA
1001 BUDAPEST, DOKSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

5006/60

52.285/BE

1. Á B R A

6/1

-12	met	thr	met	ile	thr	asn	ser	arg	gly	ser	val	asp	Ala	Pro	Met	Thr	4	
1	ATG	ACC	ATG	ATT	ACG	AAT	TCC	CGG	GGA	TCC	GTC	GAC	GCT	CCC	ATG	ACC	48	
5	Gln	Thr	Thr	Pro	Leu	Lys	Thr	Ser	Trp	Val	Asn	Cys	Ser	Asn	Met	Ile	20	
49	CAG	ACA	ACG	CCC	TTG	AAG	ACA	AGC	TGG	GTT	AAC	TGC	TCT	AAC	ATG	ATC	96	
21	Asp	Glu	Ile	Ile	Thr	His	Leu	Lys	Gln	Pro	Pro	Leu	Pro	Leu	Leu	Asp	36	
97	GAT	GAA	ATT	ATA	ACA	CAC	TTA	AAG	CAG	CCA	CCT	TTG	CCT	TTG	CTG	GAC	144	
37	Phe	Asn	Asn	Leu	Asn	Gly	Glu	Asp	Gln	Asp	Ile	Leu	Met	Glu	Asn	Asn	52	
145	TTC	AAC	AAC	CTC	AAT	GGG	GAA	GAC	CAA	GAC	ATT	CTG	ATG	GAA	AAT	AAC	192	
53	Leu	Arg	Arg	Pro	Asn	Leu	Glu	Ala	Phe	Asn	Arg	Ala	Val	Lys	Ser	Leu	68	
193	CTT	CGA	AGG	CCA	AAC	CTG	GAG	GCA	TTC	AAC	AGG	GCT	GTC	AAG	AGT	TTA	240	
69	Gln	Asn	Ala	Ser	Ala	Ile	Glu	Ser	Ile	Leu	Lys	Asn	Leu	Leu	Pro	Cys	84	
241	CAG	AAC	GCA	TCA	GCA	ATT	GAG	AGC	ATT	CTT	AAA	AAT	CTC	CTG	CCA	TGT	288	
85	Leu	Pro	Leu	Ala	Thr	Ala	Ala	Pro	Thr	Arg	His	Pro	Ile	His	Ile	Lys	100	
289	CTG	CCC	CTG	GCC	ACG	GCC	GCA	CCC	ACG	CGA	CAT	CCA	ATC	CAT	ATC	AAG	336	
101	Asp	Gly	Asp	Trp	Asn	Glu	Phe	Arg	Arg	Lys	Leu	Thr	Phe	Tyr	Leu	Lys	116	
337	GAC	GGT	GAC	TGG	AAT	GAA	TTC	CGG	AGG	AAA	CTG	ACG	TTC	TAT	CTG	AAA	384	
117	Thr	Leu	Glu	Asn	Ala	Gln	Ala	Gln	Gln	Thr	Thr	Leu	Ser	Leu	Ala	Ile	132	
385	ACC	CTT	GAG	AAT	GCG	CAG	GCT	CAA	CAG	ACG	ACT	TTG	AGC	CTC	GCG	ATC	432	
133	Phe	***																
433	TTT	TGA	GTC	CAA	CGT	CCA	GCT	CGT	TCT	CTG	GGC	CTT	CTC	ACC	ACA	GAG	480	
481	CCT	CGG	TCG	AGT	TTT	AAA	CTG	GTT	CCT	AGG	GAT	GTG	TGA	GAA	TAA	ACT	528	
529	AGA	CTC	TGA	ACA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAA	AAC	CGA	576
577	ATT	CCC	GGG	GAT	CTA	AAC	TT											

43783

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

7006/90

2. Á B R A

52.285/BE

6/2

5'

-15 met thr met ile thr asn ser arg gly ser ser ala ala ala ala Ala 1
1 ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CGG GGA TCC TCT GCA GCA GCG GCG GCT 48

... ..

3'

130 Leu Ala Ile Phe ***
433 CTC GCG ATC TTT TGA CTC GAG TAG AAG AGA AGA GAA TC

-54411-

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 183-4733

42785

1006/40

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY

52.285/BE

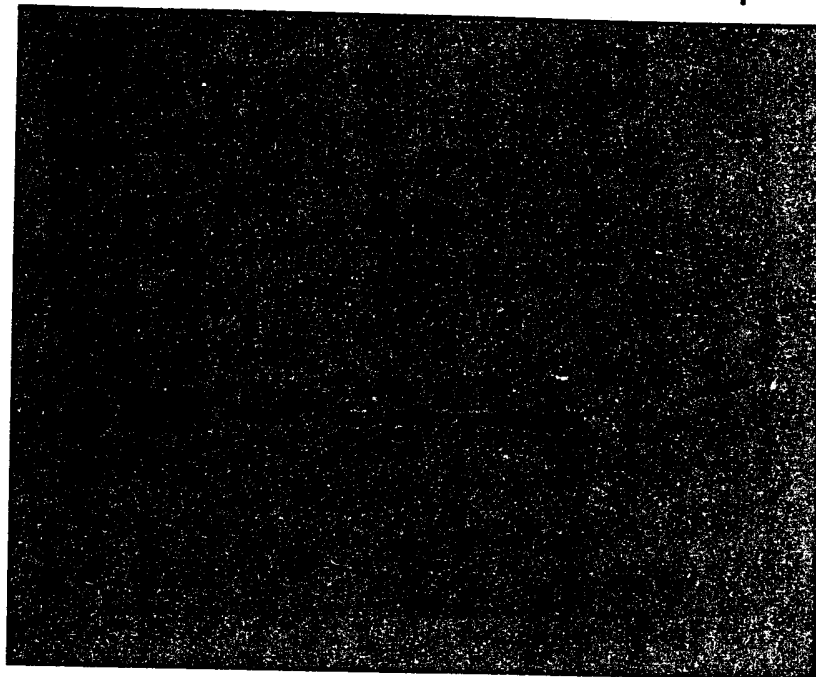
6/3

3. Á B R A

20



1



S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

42785

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

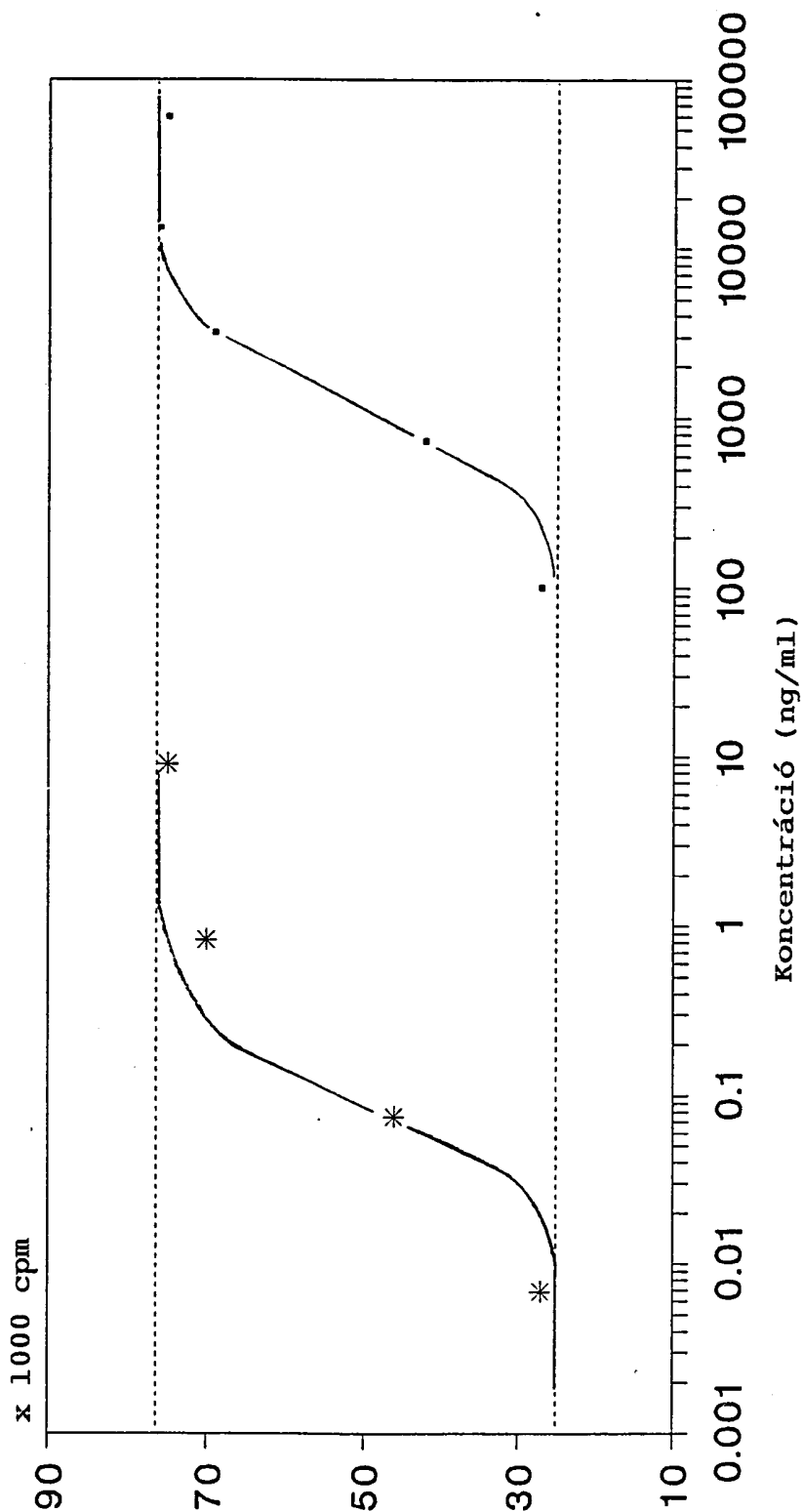
1000/70

4. Á B R A

52.285/BE

6/4

AML PROLIFERÁCIÓS VIZSGÁLAT



• 812 * Referencia

S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 163-6733

1006/90 43785

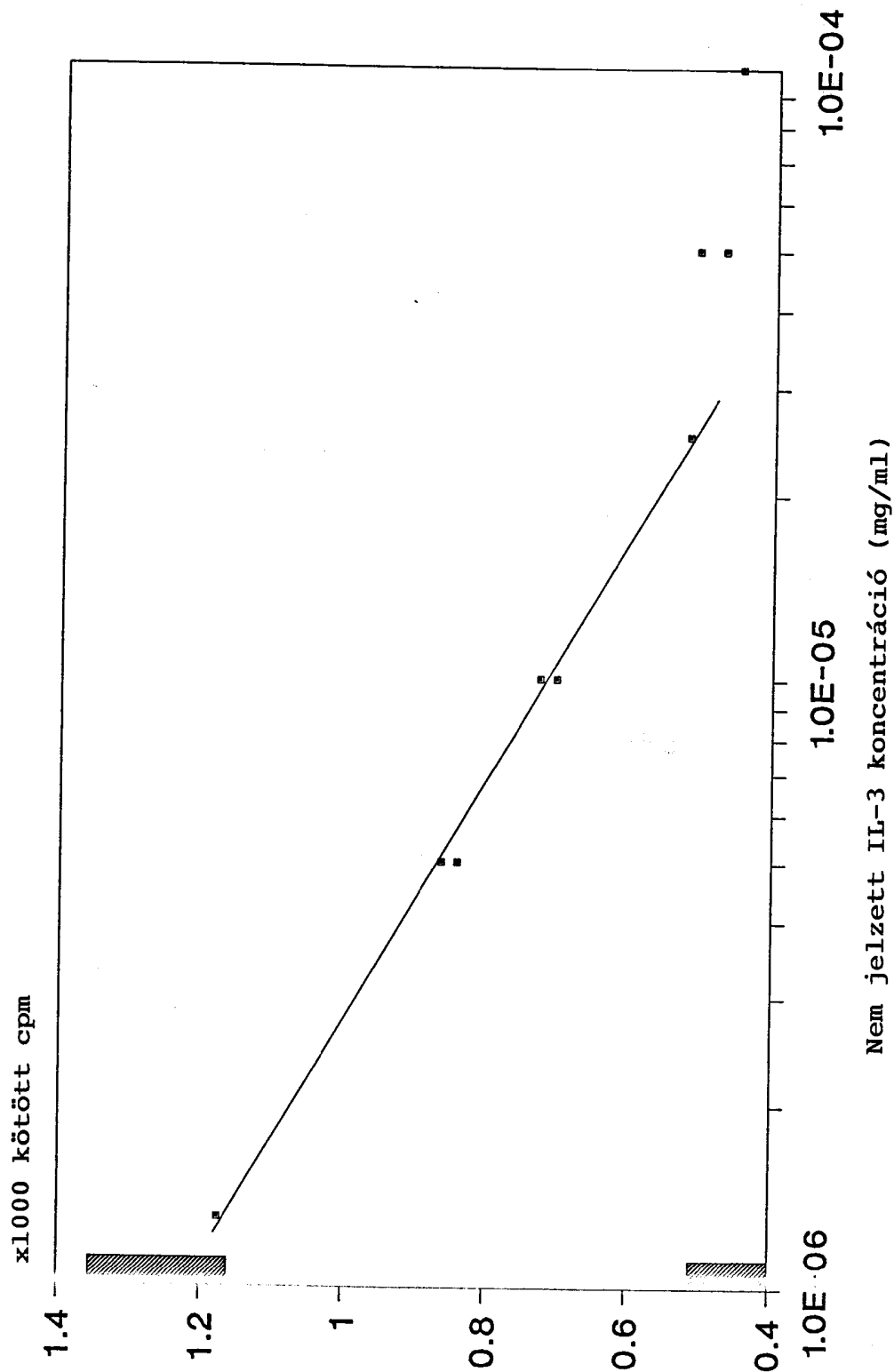
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

5. Á B R A

52.285/BE

6/5

IL-3 RECEPTOR KÖTŐDÉSI VIZSGÁLAT



S.B.C. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1081 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 153-3733

5006/90

62785

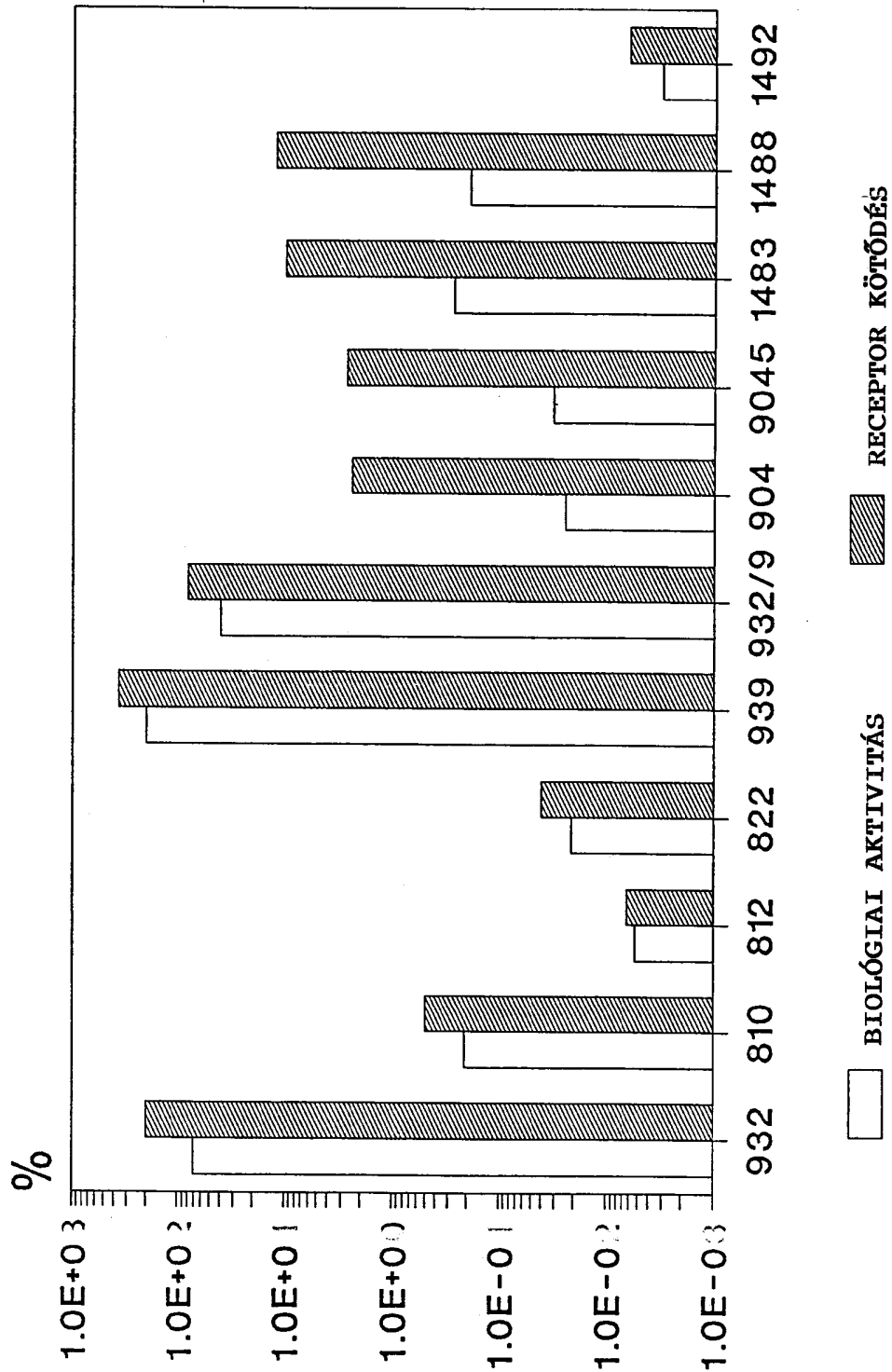
KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY

6. Á B R A

52.285/BE

6/6

IL-3 MUTÁNSOK AKTIVITÁSA



S.B.G. & K.
BUDAPESTI NEMZETKÖZI ÜGYVÉDI
ÉS SZABADALMI IRODA
1061 BUDAPEST, DALSZÍNHÁZ U. 10.
TELEFON: 143-8733