



DEUTSCHES PATENTAMT

(21) Aktenzeichen:	(22) Anmeldetag:	(41) Aufgebot zur Akteneinsicht:	(43) Veröff.-tag der Offenlegungsschrift:
DD C 12 N / 343 414 6	13. 08. 90	07. 05. 92	12. 08. 93

(30) Unionspriorität:	(32) 14. 08. 89	(33) EP
(31) 89202082.7	(32) 14. 09. 89	(33) EP
(31) 89202331.8		

(71) Anmelder bzw. Rechtsnachfolger:
GIST-Brocades N. V., Ma Delft, NL

(72) Erfinder: Dorssers, Lambertus Ch. J., 6668 An Randwijk, NL; van Leen, Robert W.,
2914 TN Nieuwerkerk A/D IJssel, NL

(74) Vertreter: Leinung, Günter, Dipl.-Jurist, Pat.-Anw., Saalestr. 60, PF 27, 39126 Magdeburg

(54) Mutanten von Human-Interleukin-3

(57) Zur Verfügung gestellt wurden Mutanten von hIL-3 mit Deletionen, die faktisch die gesamte Codierungsregion von hIL-3 umfassen und gleichzeitig ihre biologische Aktivität bewahren. Bevorzugte Mutanten sind jene mit einer oder mehreren Deletionen am Aminoende (Aminosäuren 1–14) und/oder am Carboxylende (Aminosäuren 116–133, 120–130 und/oder 130–133). Eine weitere bevorzugte Gruppe von Mutanten sind Substitutionsmutanten. Einige dieser Mutanten weisen einen antagonistischen Effekt auf. Spezifische Beispiele dafür sind Cys → Ala-Mutanten (Cys¹⁶ → Ala¹⁶, Cys¹⁶Cys⁸⁴ → Ala¹⁶Ala⁸⁴). Andere Mutanten mit einem antagonistischen Effekt sind Glu⁵⁰ → Lys⁵⁰ sowie Lys⁷⁹ → Glu⁷⁹. Schließlich werden Antikörper zur Verfügung gestellt, die auf zwischen den Aminosäuren 29 und 54 angesiedelte spezifische Epitope gerichtet sind.

Ansprüche:

1. Ein biologisch aktiver Polypeptid-Analog von Human-Interleukin-3, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine Deletion von mindestens 2 Aminosäuren, verglichen mit dem reifen Human-Interleukin-3-Molekül, umfaßt und verbesserte Eigenschaften aufweist.
2. Ein biologisch aktiver Polypeptid-Analog von Human-Interleukin-3 nach Anspruch 1, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine Deletion von mindestens 4 Aminosäuren umfaßt.
3. Ein biologisch aktiver Polypeptid-Analog von Human-Interleukin-3 nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine N-terminale Deletion von 4 Aminosäuren umfaßt.
4. Ein biologisch aktiver Polypeptid-Analog von Human-Interleukin-3 nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine N-terminale Deletion von bis zu 14 Aminosäuren und/oder eine C-terminale Deletion von bis zu 18 Aminosäuren umfaßt.
5. Ein biologisch aktiver Polypeptid-Analog von Human-Interleukin-3 nach Anspruch 1 oder 2, **dadurch gekennzeichnet**, daß er eine innere Deletion umfaßt.
6. Ein biologisch aktiver Polypeptid-Analog von Human-IL-3, **dadurch gekennzeichnet**, daß er mindestens eine der folgenden Substitutionen aufweist:

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 oder Arg ⁴⁶
Glu ⁵⁰	→	Lys ⁵⁰ oder Arg ⁵⁰
Glu ⁵⁹	→	Lys ⁵⁹ oder Arg ⁵⁹
Glu ⁵⁹	→	Gly ⁵⁹ oder Pro ⁵⁹ (α-Helixbrecher)
Arg ⁶³ Ala ⁶⁴	→	Pro ⁶³ Gly ⁶⁴
Glu ⁷⁵	→	Arg ⁷⁵ oder 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. Ein biologisch aktiver Polypeptid-Analog von hIL-3, **dadurch gekennzeichnet**, daß er antagonistische Aktivität aufweist.
8. Ein biologisch aktiver Polypeptid-Analog von hIL-3 nach Anspruch 7, **dadurch gekennzeichnet**, daß er aus der Gruppe, die aus den Mutanten Cys¹⁶ → Ala¹⁶, Cys¹⁶Cys⁸⁴ → Ala¹⁶Ala⁸⁴, Glu⁵⁰ → Lys⁵⁰ und Lys⁷⁹ → Glu⁷⁹ besteht, ausgewählt wird.
9. Ein biologisch aktiver Polypeptid-Analog von Human-IL-3, **dadurch gekennzeichnet**, daß er sowohl eine Deletion als auch eine Substitution aufweist.
10. Ein pharmazeutisches Präparat, **dadurch gekennzeichnet**, daß es als aktiven Bestandteil einen biologisch aktiven Polypeptid-Analog von Human-Interleukin-3 gemäß Definition in einem der Ansprüche 1 bis 9 oder ein Derivat davon in Verbindung mit einem pharmazeutisch zulässigen Träger umfaßt.
11. Ein pharmazeutisches Präparat nach Anspruch 10, **dadurch gekennzeichnet**, daß es des weiteren eine pharmazeutisch effektive Menge einer Substanz enthält, die aus der Gruppe von GM-CSF, CSF-1, G-CSF, M-CSF, Erythropoetin, IL-1 α, IL-1 β, IL-2, IL-4 bis IL-8 und dem Tumornekrosefaktor besteht.
12. Ein DNA-Fragment, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine DNA-Sequenz enthält, die ein Polypeptid nach einem der Ansprüche 1 bis 9 codiert.

13. Ein Klonierungshilfsmittel, **dadurch gekennzeichnet**, daß es eine DNA-Sequenz enthält, die eines der Polypeptide nach Anspruch 1 bis 9 in Verbindung mit Transkriptions- und Translationsregulierungssequenzen codiert, die die Expression besagter Polypeptide innerhalb geeigneter Wirtszellen ermöglichen.
14. Eine Wirtszelle, **dadurch gekennzeichnet**, daß sie nach Anspruch 13 mit einem Klonierungshilfsmittel transformiert wird.
15. Ein Prozeß zur Gewinnung einer DNA-Sequenz, die einen biologisch aktiven Polypeptid-Analog von Human-Interleukin-3 nach einem der Ansprüche 1 bis 9 codiert, **dadurch gekennzeichnet**, daß er umfaßt:
 - die Isolierung einer DNA-Sequenz zur Codierung des reifen hIL-3-Proteins,
 - die Ausführung der In-vitro-Mutagenese, um gewünschte Nukleotide zu deletieren oder zu substituieren.
16. Ein Prozeß zur Gewinnung eines biologisch aktiven Polypeptid-Analogs von Human-Interleukin-3 nach einem der Ansprüche 1 bis 9, **dadurch gekennzeichnet**, daß er umfaßt:
 - die Einführung der DNA-Sequenz, die besagtes Polypeptid in einem Expressionsvektor codiert, so daß es sich unter Kontrolle geeigneter Expressionsregulierungssequenzen befindet,
 - die Einführung besagten Expressionsvektors in eine geeignete Wirtszelle,
 - die Kultivierung der Wirtszellen,
 - die Gewinnung des von besagten Wirtszellen produzierten Proteins.
17. Ein monoklonaler Antikörper, **dadurch gekennzeichnet**, daß er gegen ein zwischen den Aminosäuren 29 und 54 des reifen Human-IL-3 angesiedeltes Epitop gerichtet ist.
18. Eine Methode zur Gewinnung eines monoklonalen Antikörpers, **dadurch gekennzeichnet**, daß er gegen ein zwischen den Aminosäuren 29 und 54 des reifen Human-IL-3 angesiedeltes Epitop gerichtet ist.

Gegenstand der Erfindung

Die Erfindung betrifft Mutanten von koloniestimulierenden Faktoren, die durch Verfahren auf der Grundlage von DNA-Rekombinationstechniken gewonnen werden. Ganz konkret betrifft die Erfindung Mutanten von Interleukin-3. Und noch konkreter enthalten diese Mutanten eine oder mehrere Deletionen und/oder eine oder mehrere Substitutionen. Die pharmakologische Anwendbarkeit dieser Mutanten ist von ihrer spezifischen Rezeptorbindung und den Signaltransduktionseigenschaften abhängig.

Vorgeschichte der Erfindung

Historisch gesehen kam es zunächst zur Entdeckung von hämopoetischen Zellen betreffenden Faktoren im Rahmen einer Untersuchung, bei der die Proliferation bzw. Differenzierung von Knochenmarkzellen in weichen Agrarkulturen gemessen wurde. Die diese Aktivität ausweisenden Faktoren wurden insgesamt als koloniestimulierende Faktoren (CSF) bezeichnet. Später zeigte sich, daß es eine Vielfalt von CSF gibt, die teilweise durch die hämopoetischen Familien, die stimuliert werden, klassifiziert werden können.

Bei Menschen und Nagetieren schließen diese Proteine G-CSF und M-CSF ein. Diese Proteine stimulieren die In-vitro-Bildung von vorwiegend neutrophilen Granulozyten- bzw. Makrophagenkolonien. Interleukin-2 (IL-2) stimuliert die Proliferation sowohl von aktivierten T-Zellen als auch von aktivierten B-Zellen, gilt jedoch nicht als CSF.

Gm-CSF und Interleukin-3 (IL-3, auch bekannt als Multi-CSF) stimulieren die Bildung von Makrophagen- wie auch von neutrophilen und eosinophilen Granulozytenkolonien. Außerdem stimuliert IL-3 die Bildung von Mastzellen-, Megakaryozyten- sowie reinen und gemischten Erythroidenkolonien (D. Metcalf, „The hematopoietic colony-stimulating factors“ [Die hämopoetischen CSF], 1984, Elsevier, Amsterdam, und D. Metcalf, Science 299 [1985], S. 16-22).

Wachstumsfaktorinduzierte Zellproliferation ist ein komplizierter Prozeß. Nach der hochspezifischen Bindung des Wachstumsfaktors an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche wird der Komplex durch Endozytose internalisiert und induziert eine intrazelluläre Reaktion, der häufig eine Phosphorylierung des Rezeptors vorangegangen ist (Sibley u. a., Cell 48 [1987], 913-922). Diese intrazellulären Signale resultieren in spezifischer Gentranskription und letztendlich in DNA-Synthese und Zellreplikation. Es besteht ein beträchtliches Interesse an den CSF, da sie über ein therapeutisches Potential verfügen, das darin besteht, daß Verluste an Zellen, die von Blutbildungs- und Lymphozytenstammzellen abstammen, wieder ausgeglichen werden können. Bei Human-IL-3 (hIL-3) handelt es sich um einen solchen CSF. Reifes hIL-3 setzt sich aus 133 Aminosäuren zusammen; das Protein enthält eine Disulfidbrücke und zwei potentielle Glykosylierungsorte (Yang u. a., Cell 47 [1986], 3-10). Es weist u. a. folgende Aktivitäten auf:

- 1) Stimulierung der Koloniebildung durch hämopoetische Präkursorzellen des Menschen, wobei die gebildeten Kolonien Erythroide, Granulozyten, Megakaryozyten, Granulozytenmakrophage und Mischungen daraus einschließen;
- 2) Stimulierung der DNA-Synthese durch Stammzellen (Blasten) der akuten myelogenen Leukämie beim Menschen (AML). Sobald Klarheit über die Struktur-Funktion-Beziehung des Moleküls besteht, können nützliche Agonisten und Antagonisten eines Proteins hervorgebracht werden. Im allgemeinen wird diese Beziehung durch Modifizierung, Ersetzung oder Deletion von Aminosäuren untersucht.

Auf diese Weise können Informationen über die Bedeutung jeder einzelnen Aminosäure für die Aktivität des Proteins erlangt werden. Wichtige Domänen der Proteine können das aktive Zentrum, Metall- und Cofaktorbindungsorte, Rezeptorbindungsorte, die an Untereinheitenwechselwirkungen beteiligten Aminosäuren und die antigenen Determinanten sein.

Nach erfolgter Bestimmung der Primärsequenz eines Proteins können zur Untersuchung der erwähnten Charakteristika unterschiedliche Verfahren angewendet werden. Stehen beispielsweise Primärstrukturen homologer Proteine anderer Arten zur Verfügung, dann können diese Sequenzen mit maximaler Übereinstimmung angeordnet werden. Konservierte Sequenzen sind häufig für die Bedeutung bestimmter Aminosäuren kennzeichnend.

Mit Hilfe bekannter Algorithmen sind Sekundärstrukturen vorhersagbar. Siehe dazu z. B. Hopp und Woods, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981) 3824–3828, Garnier u. a., J. Mol. Biol. 120 (1978) 97–120, Biou u. a., Prot. Eng. 2 (1988) 185–191, Cármenes u. a., Biochem. Biophys. Res. Commun. 159 (1989) 687–693.

Ist die interspezifische Homologie zwischen homologen Proteinen hoch und die 3-D-Struktur von einem bekannt, können von dieser Struktur auch wichtige Aminosäuren abgeleitet werden.

Primär- und/oder Raumstrukturdaten können zur Anwendung kommen, um begründete Schätzungen für Mutageneseexperimente anstellen zu können. Die Expression von mutationserzeugten Proteinen sowie die Erprobung dieser Muteine in biologischen Untersuchungen liefern Informationen über die relative Bedeutung bestimmter Aminosäuren.

Ziel der Erfindung ist es, IL-3-Mutanten mit ähnlichen oder verbesserten pharmazeutischen Eigenschaften – verglichen mit den originären IL-3 – auszustatten, wobei vorzugsweise die erwähnten Verfahren zur Anwendung kommen sollen.

Fachliteratur

Human-Interleukin-3

1984 wurden cDNA-Klone, die für murines IL-2 codieren, isoliert (Fung u. a., Nature 307 [1984] 233–237 und Yokota u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 [1984] 1070–1074). Diese cDNA hybridisierte nicht mit menschlichen DNA- oder cDNA-Klonen. Daraus wurde geschlossen, daß es kein menschliches Gegenstück zum murinen IL-3 (mIL-3) gibt. Diese Annahme wurde durch das breite Spektrum der Aktivitäten zum Human-GM-CSF verstärkt. 1986 ergab eine cDNA-Expressionsbank beim Gibbon schließlich die Gibbon-IL-3-Sequenz. Nach Gegenüberstellung mit einer genomischen Bank beim Menschen erbrachte die Untersuchung den Beweis für das Vorhandensein von IL-3 im Menschen (Yang u. a., Cell 47 [1986] 3–10).

Zwischenzeitlich fanden Dorssers u. a., Gene 55 (1987) 115–124, bei einer Human-cDNA-Bank ein Klon, das überraschenderweise mit mIL-3 hybridisierte. Diese Hybridisierung war das Ergebnis des hohen Grades an Homologie zwischen den 3'-nichtcodierenden Regionen von mIL-3 und hIL-3.

Modifizierte CSF (mit Ausnahme von IL-3)

Mooney u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 4428–4431, schildern die Herstellung von Human-GM-CSF mit Hilfe unterschiedlicher rekombinanter Quellen, darunter E.-coli-, Hefe- und Tierzellen. Teilweise gereinigte Expressionsprodukte aus Hefe- und Tierzellen wurden im Hinblick auf den Deglykosylierungseffekt untersucht. Nach Beseitigung der N-verbundenen Oligosaccharide stieg die Immunreaktivität um das 4- bis 8fache. Die spezifische biologische Aktivität lag bei den Untersuchungen sowohl zur chronischen Myelogenleukämie (CML) als auch zum menschlichen Knochenmark um einen Faktor von 20 höher.

Kaushansky u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 1213–1217, unternahmen den Versuch, die Region(en) des für die biologische Aktivität erforderlichen GM-CSF-Polypeptids zu bestimmen. Da menschliche und murine GM-CSF in ihren entsprechenden Koloniebildungsversuchen keine Kreuzreaktion vollziehen, stützte sich das Vorgehen auf die Verwendung von hybriden DNA-Molekülen mit unterschiedlichen Längen von Codierungsregionen für h- und mGM-CSF. Nach der Expression in COS-Zellen wurden die Hybridproteine sowohl in menschlichen als auch murinen Koloniebildungsversuchen getestet. Es zeigte sich, daß zwei GM-CSF-Regionen für die hämopoetische Funktion von ausschlaggebender Bedeutung sind. Diese Regionen sind strukturell durch eine amphiphilische Helix und durch eine disulfidgebundene Schleife gekennzeichnet.

Gough u. a., Eur. J. Biochem. 169 (1987) 353–358, beschreiben innere Deletionsmutanten der murinen GM-CSF. Von keinem der Mutanten wird biologische Aktivität berichtet.

Kuga u. a., Biochem. Biophys. Res. Com. 159 (1989) 103–111, geben eine Schilderung der humanen G-CSF. Aus den Ergebnissen wird deutlich, daß die Mehrheit der Expressionsprodukte mit Mutationen in den inneren oder C-terminalen Regionen hG-CSF-Aktivität ausschließt. Dagegen behielten N-terminale Deletionsmutanten, denen 4, 5, 7 oder 11 Aminosäuren – aus einer Gesamtheit von 174 Aminosäuren – fehlten, die Aktivität. Einige der N-terminalen Aminosäuremutanten wiesen eine verstärkte Aktivität auf.

Die Gewinnung von Deletionsmutanten des Human-Interleukin-1 (IL-1) erfolgte unter Nutzung verfügbarer Endonuclease-Restriktionsorte und Expression in eukaryotischen Zellen. Das Carboxylende (63 Aminosäuren) des Polypeptids enthält das aktive Zentrum (Makino u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 [1987] 7841–7845). Aus einer kürzlich vorgenommenen Studie von IL-1 α und IL-1 β wird ersichtlich, daß für eine vollständige biologische Aktivität 140 bzw. 147 Aminosäuren (von insgesamt 153 Aminosäuren) erforderlich sind (Mosley u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 [1987] 4572–4576). Einfache Aminosäureveränderungen an beiden Enden führten zu einer deutlichen Verringerung der biologischen Aktivität. Diese Studien erbrachten jedoch keine ausführlichen Informationen über die rezeptorbildende Domäne von IL-1.

Es zeigt sich, daß die Aktivität des Human-Interleukin-2 durch die Entfernung sowohl von Cys⁵⁸ als auch Cys¹⁰⁵ deutlich gehemmt wurde, während die Deletion des dritten Cys-Rests (125) ohne Auswirkung blieb (Wang u. a., Science 224 [1984] 1431–1433; Cohen u. a., Science 234 [1986] 349–352). Bei allen zu einer Störung der Helixfaltung dieses Proteins führenden Substitutionen wurde festgestellt, daß sie signifikante Reduzierungen der biologischen Aktivität zur Folge hatten. Der potentielle rezeptorbindende Ort von IL-2 wurde auf einem elf Aminosäure langen Peptid kartiert. Individuelle Aminosäuresubstitutionen in dieser Region zeitigten dramatische Auswirkungen (Cohen u. a. [ebenda]; Zurawski und Zurawski, EMBO J. 7 [1988] 1061–1069). Die Mutationsanalyse zeigte weiterhin, daß unterschiedliche Domänen von IL-2 an der hohen und niedrigen Affinitätsbindung des IL-2-Rezeptorkomplexes beteiligt sind (Robb u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 [1988] 5654–5658; Collins u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 [1988] 7709–7713).

Es kann gefolgert werden, daß Modifizierungen von CSF im allgemeinen einschneidende Veränderungen in der biologischen Aktivität dieser Moleküle bewirken. Der Human-G-CSF verliert beispielsweise seine Aktivität, wenn innere oder C-terminale Mutationen eingeführt wurden. N-terminale Deletionen in Human-G-CSF von bis zu 11 Aminosäuren (von insgesamt 174 Aminosäuren) dagegen beeinflussen die Aktivität nicht nachteilig, gleiches gilt für IL-1, bei dem von 153 Aminosäuren mindestens 140 für eine uneingeschränkte Aktivität erforderlich sind. Bei diesen Molekülen sind ganz eindeutig weniger als 10% der Aminosäuren entbehrlich.

Modifiziertes IL-3

Clark-Lewis u. a., Science 231 (1986) 134–139, unternahmen eine funktionelle Analyse der synthetischen murinen IL-3-Analoga. Sie gelangten zu dem Schluß, daß für die vollständige Aktivität die stabile tertiäre Struktur des kompletten Moleküls erforderlich ist. Aus einer Studie über die Rolle der Disulfidbrücken wurde deutlich, daß die Ersetzung von zwei der vier Cys-Reste durch Ala (Cys⁷⁹, Cys¹⁴⁰ → Ala⁷⁹, Ala¹⁴⁰) eine verstärkte Aktivität nach sich zog (Clark-Lewis u. a., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 [1988] 7897–7901).

Über vorgeschlagene Modifizierungen von hIL-3 gibt es nur wenig Literatur. Noch seltener allerdings ist Literatur über tatsächlich durchgeführte Modifizierungen von hIL-3. In der internationalen Patentanmeldung WO 88/00598 ist von einer „sich natürlich vollziehenden“ Ser²⁷ → Pro²⁷-Substitution die Rede. (Bemerkenswert ist, daß die Numerierung der Aminosäuren in WO 88/00598 das Signalpeptid aus 19 Aminosäuren einschließt.) Außerdem wird empfohlen, Cys durch Ser zu ersetzen, um so die Disulfidbrücke zu durchbrechen und eine oder mehrere Aminosäuren an den Glykosylierungsstellen Asn³⁴Cys³⁵Ser³⁶ und Asn⁸⁹Ala⁹⁰Ser⁹¹ zu ersetzen.

Aus EP-A-0275598 (WO 88/04691) wird deutlich, daß Ala¹ deletiert und dabei die biologische Aktivität erhalten werden kann. Einige mutante hIL-3-Sequenzen werden zur Verfügung gestellt, nämlich zwei Doppelmutanten, Ala¹ → Asp¹, Trp¹³ → Arg¹³ (pGB/IL-302) und Ala¹ → Asp¹, Met³ → Thr³ (pGB/IL-304) und ein Dreiermutant Ala¹ → Asp¹, Leu⁹ → Pro⁹, Trp¹³ → Arg¹³ (pGB/IL-303) (die Numerierung beginnt mit der ersten Aminosäure des reifen Proteins).

In WO 88/05469 wird dargelegt, wie die oben erwähnten Deglykosylierungsmutanten erlangt werden können, ebenso wie Mutanten von Art⁵⁴Arg⁵⁵ und Arg¹⁰⁸Arg¹⁰⁹Lys¹¹⁰ (in die gleiche Numerierung gebracht wie in EP-A-0275598). Letztere werden empfohlen, um die Proteolyse nach Expression in *Saccharomyces cerevisiae* durch KEX2-Protease zu vermeiden. Es wurde von keinen mutierten Proteinen berichtet. Glykosylierung und die KEX2-Proteaseaktivität sind in diesem Zusammenhang nur nach Expression in Hefe wichtig.

Schließlich erwähnt EP-A-0282185 verschiedene Mutanten, die konformations- und antigenneutral sein können. Um das zu erreichen, wird eine Reihe synonyme Aminosäuresubstitutionen empfohlen. Die vorgeschlagenen Aminosäureveränderungen zielen darauf ab, die Struktur zu bewahren und die Ladungsverteilung des IL-3-Moleküls unverändert zu lassen. Die einzig wirklich vollzogenen Mutationen sind Met² → Ile² und Ile¹³¹ → Leu¹³¹. Es wurde nicht erwähnt, ob die beabsichtigten Neutralitäten erreicht werden konnten.

Bis jetzt ist von keinen umfassenden Mutageneseexperimenten zu hIL-3 berichtet worden.

Die vorliegende Erfindung ermöglicht zwei neue Klassen von pharmakologisch interessanten Verbindungen, nämlich Deletionsmutanten und Substitutionsmutanten von hIL-3, die biologische Aktivitäten aufweisen, die jenen von hIL-3 ähnlich sind und in einigen Fällen auch entgegenwirken.

Darlegung der Charakteristik der Erfindung

Ein Aspekt der Erfindung betrifft biologisch aktive Polypeptidanaloga von Interleukin-3 (nachfolgend auch als „hIL-3-Mutanten“ oder „Muteine“ bezeichnet) mit einer Deletion von mindestens zwei Aminosäuren.

Bevorzugte Mutanten sind jene mit einer oder mehreren Deletionen am Aminoende (Aminosäuren 1–14) bzw. Carboxylende (Aminosäuren 120–130 bzw. 130–133).

Bei einem weiteren Aspekt der Erfindung werden Substitutionsmutanten von hIL-3 aufgezeigt, die mindestens eine der folgenden Substitutionen aufweisen:

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 oder Arg ⁴⁶
Glu ⁵⁰	→ Lys ⁵⁰ oder Arg ⁵⁰
Glu ⁵⁹	→ Lys ⁵⁹ oder Arg ⁵⁹
Glu ⁵⁹	→ Gly ⁵⁹ oder Pro ⁵⁹ (α-Helixbrecher)
Arg ⁶³ Ala ⁶⁴	→ Pro ⁶³ Gly ⁶⁴
Glu ⁷⁵	→ Arg ⁷⁵ oder Gly ⁷⁵
Lys ⁷⁹	→ Glu ⁷⁹
Arg ⁹⁴	→ Pro ⁹⁴
His ⁹⁸ Lys ¹⁰⁰ Asp ¹⁰¹	→ Glu ⁸⁸ 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

Ein wiederum anderer Aspekt der Erfindung verweist auf Substitutionsmutanten von hIL-3, die bei der Rezeptorbindung wirksamer sind als bei der Stimulierung der DNA-Synthese, also auf Antagonisten. Genauer gesagt, handelt es sich dabei um einfache oder doppelte Cys-Mutanten. Cys wird vorzugsweise durch Ala ($\text{Cys}^{16} \rightarrow \text{Ala}^{16}$, $\text{Cys}^{16}\text{Cys}^{84} \rightarrow \text{Ala}^{16}\text{Ala}^{84}$) ersetzt. Andere Mutanten mit antagonistischem Effekt sind $\text{Glu}^{50} \rightarrow \text{Lys}^{50}$ und $\text{Lys}^{79} \rightarrow \text{Glu}^{79}$.

Die erwähnten Polypeptide erlangt man durch Expression von entsprechend modifizierten DNA-Sequenzen. Aus diesem Grunde bietet die Erfindung auch geeignete Expressionsvektoren und Wirtszellen, die damit kompatibel sind.

Im Hinblick auf weitere Aspekte umfaßt die Erfindung pharmazeutische Präparate, zu denen die oben erwähnten biologisch aktiven Peptidanalogue von hIL-3, in Verbindung mit einem pharmazeutisch zulässigen Träger, gehören.

Die Erfindung verweist schließlich auf monoklonale Antikörper, die auf ein zwischen den Aminosäuren 29 und 54 angesiedeltes Epitop abzielen.

Diese und andere Aspekte werden in der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung weiter dargelegt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

Fig. 1 zeigt die Nucleotid- und translatierte Aminosäuresequenz des Fusionsproteininserts von pGB/IL-336. Bei Aminosäuren, die in Kleinbuchstaben angegeben sind, handelt es sich um nicht-hIL-3-Aminosäuren, die IL-3-Proteinsequenz beginnt bei Ala 1.

Fig. 2 zeigt die 5'- und 3'-Sequenzveränderungen, die eingeführt wurden, um pGB/IL-339 zu erhalten. Wie in Abb. 1 verweisen die Aminosäuren mit Kleinbuchstaben auf nicht-hIL-3-Aminosäuren, die reife IL-3-Proteinsequenz beginnt bei Ala 1.

Bei Fig. 3 handelt es sich um eine Aufnahme des Polyacrylamidgels der folgenden 19 IL-3-Mutanten (Bahnen 1 bis 19): pGB/IL-336, pGB/IL-339, 932, 810, 934, 812, 935, 813, 936, 820, 937, 821, 938, 822, 939, 9329, 904, 905, 9045; und des Pharmacia-LMW-Markers (Bahn 20). Mit diesen Zahlen übereinstimmende Mutationen werden in Tab. 4 aufgeführt.

Fig. 4 zeigt einen AML-Proliferationsversuch für IL-3 (*) und IL-3-Mutant 821 (*).

Fig. 5 zeigt ein Experiment einer IL-3-Rezeptorbindung. Radioaktiv markierte IL-3-Bindung an AML-Patientenstammzellen wird mit unmarkiertem IL-3-Protein konkurrenzreagiert (Bezugspräparat). Aufgezeigt werden die Ebenen der nichtspezifischen (unterer Streifen) und der höchsten Gesamtbindung (oberer Streifen) in diesem Experiment (siehe Beispiel 5).

Fig. 6 zeigt einen Vergleich von ausgewählten mutanten IL-3-Proteinen unter dem Gesichtspunkt der relativen biologischen Aktivität (nichtschrattierte Säulen) und der relativen Bindungsaktivität (schrattierte Säulen). Verwiesen wird auf den Prozentsatz der Aktivität im Vergleich zum IL-3-Bezugspräparat (Tab. 4).

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

Gemäß der vorliegenden Verwendung entspricht IL-3 der in Tab. 1 dargestellten Aminosäure (1–133). Inbegriffen sind auch natürlich auftretende Varianten. Im Begriff IL-3 enthalten sind weiterhin hIL-3-Moleküle, die nach der Translation (z. B. durch Glykosylierung) modifiziert wurden. Unter IL-3-Derivaten ist jedes IL-3-Molekül zu verstehen, das chemisch oder enzymatisch modifiziert wurde und damit mindestens einen Teil seiner biologischen Aktivität beibehält.

Analoge von Human-IL-3 beziehen sich gemäß der vorliegenden Verwendung auf Moleküle mit einer Sequenz, die durch eine oder mehrere Deletionen oder Substitutionen vom reifen IL-3 abweicht.

Human-IL-3 ist weiterhin durch seine biologische Aktivität zur Stimulierung der Koloniebildung durch menschliche hämopoetische Präkursorzellen gekennzeichnet. Die gebildeten Kolonien schließen Erythroide, Granulozyten, Megakaryozyten, Granulozytenmakrophage und Mischungen daraus ein. Die biologische Aktivität von hIL-3 kann (für den vorliegenden Zweck) weiter in zwei Teile untergliedert werden – Signaltransduktion und Rezeptorbindung.

Bei einem hIL-3-Analog bedeutet erfindungsgemäß der Verweis auf verbesserte Eigenschaften, daß der Analog über ein besseres Signaltransduktions/Rezeptorbindungsverhältnis verfügt. „Besser“ hängt dabei von den gewünschten Eigenschaften ab, z. B. von einem höheren Bindungskoeffizienten für einen Antagonisten oder einer gleichen oder höheren biologischen Aktivität für einen Deletionsmutanten. „Besser“ kann auch bedeuten, daß der Polypeptidanalogue geringere Neigung zur Bildung von Aggregaten zeigt.

Für den vorliegenden Zweck wird die (biologische) Aktivität des Human-IL-3-Analogs durch DNA-Synthese mittels akuter myelogener Stammzellen des Menschen bestimmt. Außerdem werden Rezeptorbindungsversuche mit Spenderleukozyten, AML-Patientenzellen oder MV4-11-Zellen durchgeführt.

IL-3 ist sowohl bei der Rezeptorbindung als auch bei der Signaltransduktion aktiv. Wäre es möglich, diese Aktivitäten auf spezifische Aminosäuresequenzen zurückzuführen, die entweder kontinuierlich oder diskontinuierlich sein können, dann wäre es auch möglich, die Bindungs- und Signaltransduktionsaktivitäten abzukoppeln. Damit wäre die Produktion spezifischer IL-3-Rezeptorantagonisten möglich.

Zur Erreichung dieser Ziele sind – als erster Schritt – klare Kenntnisse über die Struktur-Funktion-Beziehung von hIL-3 erforderlich. Durch Einführung einer Vielfalt von Mutationen im Protein können die Eigenschaften des natürlich auftretenden oder natürlich mutierten IL-3 geändert werden. Derartige Veränderungen werden unter Nutzung der beschriebenen Mutageneseverfahren entsprechend eingeführt und die mutierten Moleküle (hIL-3-Muteine) unter Nutzung der beschriebenen Expressionsvektoren angemessen synthetisiert.

Zur Bestimmung der Struktur-Funktion-Beziehung kommen u. a. die folgenden Mutageneseverfahren in Betracht:

- Ersetzung einer Aminosäure durch einen isosteren Rest unterschiedlicher Funktion, z. B. Asp durch Asn. Damit werden die Wasserstoffbindungseigenschaften bewahrt und gleichzeitig die Ladung beseitigt;
- Ersetzung einer Aminosäure durch eine andere mit identischer Funktion, jedoch unterschiedlicher Struktur, z. B. Glu durch Asp, wobei eine Carboxylgruppe durch etwa 1 Å verschoben würde;
- Ersetzung einer Aminosäure durch eine andere mit unterschiedlicher Funktion;
- Einführung oder Beseitigung von Disulfidbrücken;
- Aufbau von Deletionsmutanten;
- Einführung von Helixbrechern (z. B. Pro);
- Aufbau von Insertionsmutanten;
- Schaffung von Glukosylierungsmutanten.

Ein Aspekt der Erfindung besteht in der Entwicklung eines spezifischen Antagonisten, der den Rezeptor blockiert, indem er sich spezifisch daran bindet, vorzugsweise mit einem hohen Bindungskoeffizienten, womit die Signaltransduktion verhindert wird. Antagonist kann jedes chemische Molekül sein, das mit dem Rezeptor eine Bindung eingeht und damit die Bindung des Agonisten verhindert. Die Erfindung zielt besonders auf Proteine ab, die einen solchen Blockierungseffekt aufweisen. Ein Aspekt der Erfindung besteht darin, daß hIL-3-Mutante ermöglicht werden, die zumindest von teilweise antagonistischer Wirkung sind. Konkret handelt es sich dabei um einzelne oder doppelte Cys-Mutanten. Cys wird vorzugsweise durch Ala ersetzt (Cys¹⁶ → Ala¹⁶, Cys¹⁶Cys⁸⁴ → Ala¹⁶Ala⁸⁴). Andere Mutanten mit einem antagonistischen Effekt sind Glu⁵⁰ → Lys⁵⁰ und Lys⁷⁹ → Glu⁷⁹. Es ist vorstellbar, daß die Verabreichung einer signifikanten Dosis der beschriebenen Mutanten die Bindung des physiologisch verfügbaren IL-3 verhindert und damit seine antagonistische Aktivität erkennen läßt.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung betrifft Proteine mit hIL-3- oder hIL-3-ähnlicher Aktivität, die vorzugsweise um ca. 3 bis ca. 25% kleiner als das natürliche hIL-3-Molekül sind. Wie aus den Beispielen weiter hervorgeht, läßt sich durch die Einführung spezifischer Deletionen bestimmen, welcher Teil des Moleküls für die Rezeptorbindung und die Signaltransduktion unerlässlich ist. In wiederum einem anderen Aspekt der Erfindung werden Aminosäuren ermöglicht, die für die Rezeptorbindung bzw. die Signaltransduktion wichtig sind.

Im einzelnen wurden zwei Arten von Mutanten hergestellt: a) Deletionsmutanten und b) Substitutionsmutanten. Es wird davon ausgegangen, daß mit Hilfe der erwähnten Methoden leicht Kombinationen dieser Mutanten erlangt werden können.

Es wurden Deletionsmutanten hergestellt, die zusammen faktisch die gesamte Codierungsregion erfassen. Bei den erfindungsgemäß verwendeten Deletionen kann es sich um jede Aminosäuredeletion von mindestens zwei aufeinanderfolgenden (oder separierten) Aminosäuren handeln. Vorzugsweise können vier oder mehr Aminosäuren deletiert werden. Besagte Deletionen können bei einer beliebigen Aminosäure im Molekül (nur nicht in unmittelbarer Nähe des Carboxylendes) beginnen, Möglich sind auch zwei separierte Deletionen im Molekül (z.B. zweimal eine Aminosäuredeletion, zweimal zwei usw.). In einer der am stärksten bevorzugten Ausführungsformen werden 32 Aminosäuren deletiert, 14 am Aminoende und 18 am Carboxylende des Proteins. Überraschenderweise zeigten alle Deletionsmutantenproteine nach der Expression eine spezifische IL-3-Bioaktivität, allerdings zumeist sehr stark vermindert. Daraus kann geschlossen werden, daß es auf dem Protein keine einzelne kontinuierliche Peptidomäne gibt, die mit dem Rezeptor eine Bindung eingeht.

Vier der Mutanten, der N-terminale Deletionsmutant ohne die Aminosäuren 1 bis 14, der C-terminale Deletionsmutant ohne die Aminosäuren 120 bis 130, der Doppelmutant davon sowie der C-terminale Mutant 130-133, zeigten biologische und Bindungsaktivität, die mit der des natürlichen IL-3-Moleküls vergleichbar ist. Es überrascht, daß hIL-3, dem bis zu 25 Aminosäuren fehlen (etwa 20% des hIL-3 in voller Länge), noch immer seine uneingeschränkte Aktivität aufweist. Angesichts von Cys¹⁶, das an der Bildung einer Disulfidbrücke beteiligt ist, ist zu erwarten, daß ein -15N-terminaler Deletionsmutant seine volle Aktivität bewahrt. Die Doppel-Deletionsmutanten, denen die 14N-terminalen und bis zu 18C-terminalen Aminosäuren fehlen (Tab. 4, X und Z), bewahren dennoch die volle Aktivität. Solche Mutanten, denen bis zu 32 Aminosäuren fehlen, büßen höchstens etwa 25% des ursprünglichen Moleküls ein. Da dieser Doppelmutant die volle Aktivität bewahrt, ist zu erwarten, daß auch der -18C-terminale Mutant voll aktiv sein wird.

Es wurden auch Mutanten mit nur inneren Deletionen hergestellt. Erfindungsgemäß wird ein innerer Deletionsmutant mit völlig beibehaltener Aktivität beschrieben, dem die Aminosäuren 120 bis 130 (Tab. 4, 939) fehlen. Es besteht die Wahrscheinlichkeit, daß noch mehr solcher Mutanten hergestellt werden können. Aus Verfahrensgründen ist es vielleicht von Vorteil, die ersten Aminosäuren des reifen IL-3-Proteins zu bewahren. Da der -14N-terminale Deletionsmutant die volle Aktivität beibehält, wird erwartet, daß auch ein innerer Deletionsmutant in der N-terminalen Region seine Aktivität bewahrt. Eine weitere Region, in der eine Deletion mit Erfolg eingeführt werden könnte, ist offensichtlich die Gln²⁹-Leu³⁵-Region. Die Deletion von 1 bis 7 Aminosäuren, möglicherweise in Verbindung mit einer Lys²⁸ → Pro²⁸-Substitution, könnte eine weitere Reihe innerer Deletionsmutanten liefern.

Die Entdeckung, daß die Aktivität von hIL-3 in den dargestellten Doppelmutanten oder bei jedem anderen Mutanten, dem große Teile von Protein (z. B. etwa 25%) fehlen, anhält, weist einen weiteren potentiellen Vorteil auf. Ein pharmazeutisches Präparat, das hIL-3 enthält, kann parenteral, intravenös oder subkutan verabreicht werden. Die Anwendung eines aus biologisch abbaubarem Polymer zusammengesetzten Hydrogels, das das Polypeptid einschließt und besagtes Polypeptid kontinuierlich freisetzt, ist durch die Peptidmenge, die eingeschlossen werden kann, begrenzt. Die Verwendung eines Deletionsmutanten des Polypeptids mit höherer spezifischer Aktivität impliziert, daß auf molarer Basis im gleichen Volumen mehr aktive Substanz eingeschlossen werden kann, wodurch sich der Zeitabstand zwischen den Verabreichungen vergrößert oder möglicherweise eine mehrfache Verabreichung nicht erforderlich ist.

Substitutionsmutanten wurden durch die Einführung spezifischer Mutationen im DNA-Bereich geschaffen, wobei Aminosäuresubstitutionen in das codierte Protein gelangen. Diese Substitutionen können in Regionen eingeführt werden, die für die Konformation oder die Aktivität des Proteins von Bedeutung sind. Beispiel für eine solche Mutation ist eine Mutation, die die zwischen Cys¹⁶ und Cys⁸⁴ bestehende Disulfidbrücke stört. Durch Ersetzung eines (oder beider) Cysteinreste durch ein Alanin kann die Brücke nicht gebildet werden, woraus eine stark verringerte Aktivität resultiert. Alle drei der möglichen Mutanten wurden hergestellt, und sie zeigen in einer Rezeptorbindungsstudie eine relativ hohe Bindungsaktivität (verglichen mit der biologischen Aktivität). Da unterschiedliche Verhältnisse von relativer Bindungsaktivität zu relativer biologischer Aktivität (Tab. 4) festgestellt werden, kann es vorteilhaft sein, Kombinationen der dargestellten IL-3-Analoga zu verwenden. Außerdem kann es auch von Vorteil sein, Polypeptidanaloga mit sowohl einer oder mehreren Deletionen und einer oder mehreren Substitutionen zu verwenden.

Das Brechen der Disulfidbrücke hat eine substantielle Veränderung der Raumstruktur des Subjektproteins zur Folge, auch andere Aminosäuresubstitutionen beeinflussen diese Struktur und damit die Aktivität.

Aus Sekundärstrukturmessungen (Zirkulardichroismus) geht hervor, daß das hIL-3-Molekül einen hohen Prozentsatz (70% bei 20°C) an α -Helices aufweist. Aus Sekundärstrukturvorhersageprogrammen (z. B. Hopp und Woods, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 [1981] 3824-3828, Garnier u. a., J. Mol. Biol. 120 [1978] 97-120, Biou u. a., Prot. Eng. 2 [1988] 185-191, Cármenes u. a., Biochem. Biophys. Res. Commun. 159 [1989] 687-693) geht hervor, daß diese α -Helices zwischen den folgenden Aminosäuren angesiedelt sind: Met¹⁹ - His²⁶, Gly⁴² - Arg⁵⁵, Leu⁵⁸ - Glu⁶⁹, Ala⁷¹ - Leu⁸¹, Leu⁸⁷ - His⁹⁵, His⁹⁸ - Leu¹¹¹ und Leu¹¹⁵ - Ala¹²¹.

In Betracht der Ladungsverteilung in den α -Helices und aufgrund der Möglichkeit, daß diese Ladungen bei der Wechselwirkung mit dem Rezeptor eine wichtige Rolle spielen, werden erfindungsgemäß auch die folgenden „Ladungsumkehrungs“ substitutionen eingeschlossen:

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 oder Arg ⁴⁶
Glu ⁵⁰	→	Lys ⁵⁰ oder Arg ⁵⁰
Glu ⁵⁹	→	Lys ⁵⁹ oder Arg ⁵⁹
Glu ⁵⁹	→	Gly ⁵⁹ oder Pro ⁵⁹ (α -Helixbrecher)
Arg ⁶³ Ala ⁶⁴	→	Pro ⁶³ Gly ⁶⁴
Glu ⁷⁵	→	Arg ⁷⁵ oder 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

Zur Veränderung der Glykosylierungsorte können sowohl Deletions- als auch Substitutionsmutanten verwendet werden. Das ermöglicht je nach Wunsch die Herstellung von glykosylierten oder unglykosylierten Polypeptiden in eukaryotischen Wirtszellen. Die oben beschriebenen Mutanten wurden bei Epitopkartierungsexperimenten verwendet, um exponierte Segmente des Moleküls, die bei der Rezeptorbindung von Bedeutung sein können, zu lokalisieren. Zu diesem Zweck wurden monoklonale Antikörper gegen reifes hIL-3 präpariert. Nachfolgend wurden diese Antikörper bei Western-Blotting-Experimenten gegen Mutantenproteine eingesetzt. Zumindest ein antigenes Fragment konnte entdeckt werden.

Erfindungsgemäß werden die neuen hIL-3-Mutanten durch ortsspezifische Mutagenese angemessen präpariert, doch es können zur Gewinnung modifizierter Proteine auch zahlreiche andere, in der Fachwelt bekannte Verfahren verwendet werden.

Zu den geeigneten, zur Umwandlung von Mikroorganismen fähigen Vektoren, die die mutierten DNA-Sequenzen, welche die gewünschten hIL-3-Mutanten codieren, ausprägen können, gehören Expressionsvektoren mit besagten, von der reifen hIL-3-Codierungssequenz abgeleiteten mutierten Sequenzen, die mit Expressionsregulierungsregionen und Terminatorregionen verbunden sind. Diese Regionen werden abhängig von den prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen, die als Wirtszellen dienen, ausgewählt. Als Wirtsstämme werden vorzugsweise *E. coli* oder *Bacillus* verwendet. Eingesetzt werden können jedoch auch Pilz-, Hefe- und Gewebekulturzellen (siehe EP-A-0275598).

Zu den Expressionsvektoren für *E. coli* gehören pGB/IL-336 und pGB/IL-339, die jeweils den lacZ-Promotor enthalten, sowie für *Bacillus* pGB/IL-322, der den α -Amilasepromotor und das Signalpeptid enthält, und deren Derivate. Andere geeignete Vektoren zur Expression in *Bacillus* sind beispielsweise der Hpall-Promotor, der Vektoren und Derivate davon umfaßt. Diese und andere Vektoren werden alle in EP-A-0275598 und EPA 90200624.6 (eingereicht am 15. März 1990 auf der Grundlage der folgenden Prioritäten: EPA 89200660.2, eingereicht am 15. März 1989, und EPA 89201967.0, eingereicht am 25. Juli 1989) beschrieben.

Aus Zweckmäßigkeitsgründen kann es nützlich sein, Expressionskonstruktionen zu verwenden, die in der Lage sind, das Protein aus der Wirtszelle abzusondern. Das geschieht beispielsweise in den verwendeten *Bacillus*-Konstruktionen. Möglich ist auch die Isolierung aus Einschlußkörpern, wie hier beim *E. coli* dargestellt.

Die Reinigung des nach der Expression erhaltenen Polypeptids hängt von der Wirtszelle und der verwendeten Expressionskonstruktion ab. Im allgemeinen kann die Reinigung von hIL-3-Mutanten in der gleichen Art und Weise wie die Reinigung von natürlichen hIL-3 erfolgen. Um hochreine hIL-3-Mutane zu erhalten, werden folgende Schritte unternommen: hydrophobe Wechselwirkungschromatografie mit anschließender Anionenaustauschchromatografie, wahlweise gefolgt von Gelfiltration. Es kann auch ausreichen, nur einen oder zwei dieser Reinigungsschritte vorzunehmen (eine ausführliche Beschreibung der Reinigung von hIL-3 erfolgt in EPA 90200624.6, eingereicht am 15. März 1990, auf der Grundlage der folgenden Prioritäten: EPA 89200660.2, eingereicht am 15. März 1989, und EPA 89201967.0, eingereicht am 25. Juli 1989).

Es wurden also nach Expression in *E. coli* als erstem Schritt die das Protein enthaltenden Einschlußkörper isoliert. Nach Beschallung in 8M-Harnstoff wurde das Protein mittels Anionenaustauschchromatografie weiter gereinigt. Nach der Entfernung des Harnstoffs erbrachte die Filtersterilisierung ein Protein, das dann zur biologischen und biochemischen Charakterisierung verwendet wurde. Die Verwendung von *Bacillus* als Wirtstamm erbrachte in Verbindung mit der Absonderung der Polypeptide nach Kombination von hydrophober Wechselwirkungs- und Anionenaustauschchromatografie hochreine Polypeptide.

Außerdem wird deutlich, daß Mutanten mit veränderten Ladungen unterschiedliche physikalische Eigenschaften aufweisen können, die spezielle Elutionsbedingungen oder andere Säulenstoffe als die in den Beispielen verwendeten erfordern.

Die gereinigten Muteine können durch Beimischung eines pharmazeutisch zulässigen nichttoxischen Trägers als pharmazeutische Präparate hergestellt werden. Wie bereits erwähnt, können derartige Präparate zur parenteralen (subkutanen, intramuskulären oder intravenösen) Verabreichung, insbesondere in Form von flüssigen Lösungen oder Suspensionen, angefertigt werden. Die Präparate können zweckmäßigerweise in Dosierungseinheiten verabreicht und mit Hilfe bekannter pharmazeutischer Verfahren, z. B. gemäß „Pharmaceutical Sciences“ von Remington, Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1970, hergestellt werden. Rezepturen zur parenteralen Verabreichung können als gemeinsame Trägerstoffe steriles Wasser oder Kochsalzlösung, Polyalkylenglykole wie Polyethylenglykol, Öle pflanzlicher Herkunft, hydrierte Naphtalane u. ä. enthalten. Die erfindungsgemäßen Stoffe können als einziger Wirkstoff in einem Pharmazeutikum oder in Verbindung mit anderen aktiven Bestandteilen verwendet werden. Weitere aktive Bestandteile können z. B. aus entsprechenden Hämatoopoetinen, CSF und Interleukinen ausgewählt werden. Dazu gehören GM-CSF, CSF-1, G-CSF, M-CSF, Erythropoetin, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4 bis IL-8 und der Tumornekrosefaktor.

Zur Untersuchung der biologischen Aktivität und Wirksamkeit der erfindungsgemäßen hIL-3-Analoge steht eine Vielzahl von Tests zur Verfügung. Beispielsweise kann der Analog mit herkömmlichen Verfahren erprobt werden, um festzustellen, ob das Protein die Koloniebildung durch hämopoetische Human-Präkursorzellen stimuliert. Zu den gebildeten Kolonien gehören Erythroide, Granulozyten und Granulozytenmakrophage. Als Alternative dazu kann auch die Fähigkeit der Subjektanaloge zur Stimulierung der DNA-Synthese durch AML-Stammzellen, wie beispielsweise durch markierte Thymidinaufnahme bewiesen, zum Nachweis der Aktivität herangezogen werden.

Die biologisch aktiven Polypeptidanaloge von Human-IL-3 gemäß der Erfindung können sowohl für therapeutische als auch diagnostische Zwecke genutzt werden. Zu den therapeutischen Verwendungszwecken gehören die Behandlung und Verhinderung von malignen und nichtmalignen Erkrankungen. Aufgrund der besonderen Eigenschaften der dargelegten Mutanten läßt sich die Anwendung verbessern.

Zu den Anwendungsformen gehören die Behandlung von:

- Zytopenien und/oder Immunsuppression aufgrund von Infektionen,
- Zytopenien aufgrund von Chemotherapie und/oder Bestrahlung,
- Knochenerkrankungen wie Frakturen und Osteoporose und von
- Immundefekten aufgrund von Vollnarkoseverfahren sowie
- Rekonvaleszenz nach Knochenmarktransplantation und
- die Unterstützung von Impfbehandlungen und der Therapie bei Infektionen.

Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung weiter veranschaulichen, sie aber in keiner Weise einschränken:

VERSUCHE

Beispiel 1

Aufbau von Expressionsvektoren

Aufbau von pGB/IL-336

Zur Gewinnung eines Polypeptids, das dem reifen Human-IL-3 sehr nahekommt, wurde eine Konstruktion gewählt, der die 5'-nichttranslatierten und signalpeptidcodierenden Sequenzen fehlen. Das IL-3-cDNA-Insert von pLH1 (siehe EP-A-0275598) wurde mit HincII und HindIII exzidiert, mit einem synthetischen Oligonucleotid (Sall-Überhang/stumpf, 419/420, Tab. 1) ligiert, das die Sequenz mit der Codierung der N-terminalen 14 Aminosäuren des reifen IL-3 umfaßt, und in Sall-HindIII-digiertes pTZ18R (Pharmacia) eingebaut. Nach Verifikation der Sequenz wurde das vollständige Insert zur Proteinherstellung auf pUC8 übertragen (wie zuvor in EP-A-0275598 beschrieben), was Plasmid pGB/IL-335 erbrachte. Um eine direkte Sequenzbestimmung und Mutagenese zu ermöglichen, wurde das PvuI-Fragment des Plasmids pTZ18R, das den f1-Replikationsstartpunkt trägt, zur Ersetzung des entsprechenden PvuI-Fragments von pUC8 verwendet. Das resultierende bakterielle Expressionsplasmid pGB/IL-336 ergibt ein Fusionsprotein von 145 Aminosäuren mit einer errechneten relativen Molekülmasse von 16384 Dalton (Fig. 1).

Aufbau von pGB/IL-339

Ein alternatives Expressionsplasmid wurde gebaut, um den wirksamen Transfer von potentiell interessanten Mutanten in Bacillus-Expressionsvektoren zu erleichtern (siehe unten). Zu diesem Zweck wurde pGB/IL-336 mit HpaI und HindIII digiert, um den größten Teil des 3'-Endes des IL-3-cDNA zu entfernen. Die hervorstehenden Enden wurden abgestumpft, und nachfolgend wurde ein stumpfes Fragment mit den entsprechenden IL-3-Sequenzen (nt 137-497) und dem B. licheniformis-Alpha-Amylase-Terminator vom Plasmid pGB/IL-337 hineinligiert, was Plasmid GB/IL-338 erbrachte. Der Aufbau von pGB/IL-337 erfolgte aus pGB/IL-324 (gemäß EPA 892019670, die durch Verweis hier enthalten ist) durch Herausschaltung der 3'-nichtcodierenden IL-3-cDNA und Alpha-Amylase-Struktursequenzen zwischen dem IL-3-Stopcodon in cDNA und dem Alpha-Amylase-Terminator, wobei ein synthetisches Oligonucleotid (Tab. 1, 944) verwendet wurde. Dieses Oligonucleotid führte auch einen XhoI-Ort unmittelbar stromabwärts vom IL-3-Stopcodon ein. Das Plasmid pGB/IL-338 wurde mit BamHI und HincII digiert, und ein Teil der Polylinker- und 5'-terminalen IL-3-Sequenzen wurde durch die phosphorylierten synthetischen Oligonucleotide 1055/1056 (Tab. 1) ersetzt, was Plasmid pGB/IL-339 erbrachte. Auf diese Weise wurde das IL-3-Gen mit einer leicht modifizierten heterologen signalpeptidcodierenden Sequenz rekonstruiert. Danach wurde ein Fusionsprotein von 148 aa mit einer errechneten relativen Molekülmasse von 16541 Dalton synthetisiert (Abb. 2). Die DNA-Sequenz von pGB/IL-339 wurde verifiziert und für korrekt befunden. Die biologische Aktivität des ausgeprägten Fusionsproteins erwies sich als unverändert. Aufgebaut wurde ein weiterer E. coli-Expressionsvektor pGB/IL-340, in dem dem lacZ-Promotor unmittelbar Sequenzen folgen, die das exakt zu reifem IL-3 fusionierte Bacillus-Alpha-Amylase-Signalpeptid codieren, wobei sich der Amylaseterminator stromabwärts befindet. Dieses Plasmid, das auch als Zwischenprodukt für den Aufbau von Bacillus-Expressionsvektoren dient, wurde durch Einführung des NdeI-KpnI-Fragments vom pGB/IL-337 aufgebaut und überträgt alle gerade erwähnten Sequenzen in den NdeI-KpnI-aufgespaltenen E. coli-Vektor pTZ18RN. pTZ18RN ist pTZ18R (Pharmacia), unmittelbar stromaufwärts vom lacZ-ATG-Startcodon modifiziert, um einen NdeI-Ort einzuführen, wobei Oligonucleotid 731 Verwendung findet (siehe Tab. 1). pGB/IL-340 bewirkt eine hohe Produktion von IL-3 in E. coli.

Beispiel 2

Aufbau von Deletions- und Substitutionsmutanten

Durchgeführt wurde In-vitro-Mutagenese, wobei gemäß dem von Kunkel u. a. (1987), Meth. Enzymol. 154, 367-382, entwickelten Verfahren synthetische Oligonucleotide (Tab. 1 und 2) zur Anwendung kamen. Einzelsträngige Matrizen-DNA wurde durch Transformation von pGB/IL-336- oder pGB/IL-339-DNA in einen E. coli-Stamm CJ236 (BioRad) und Superinfektion mit einem M13K07 (Pharmacia)-Helferphagen präpariert. Die Phagen-DNA wurde nach Standardverfahren hergestellt und auf 0,6% bei niedriger Temperatur schmelzender Agarose fraktioniert, um den Helferphagen ssDNA zu entfernen. Die exzidierte Bande wurde mit Phenol geschmolzen und extrahiert. pGB/IL-336 oder pGB/IL-339 ssDNA wurde durch Butanolkonzentration und Ethanol-fällung gewonnen und für primerabhängige DNA-Synthese in einer Sequenzierungsreaktion getestet.

Gereinigtes pGB/IL-336 oder pGB/IL-339 ssDNA (± 100 ng) wurde mit 20 ng phosphoryliertem Primer bei 65°C geglüht und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Bei der Synthese des komplementären Strangs wurden 1–2 µg des Gen-32-Proteins, 4 Einheiten der T4-DNA-Polymerase und 2,5 Einheiten der T4-DNA-Ligase verwendet. Die Reaktion erfolgte bei 0°C 5 Minuten, bei 20°C 10 Minuten und bei 37°C 90 Minuten lang. Nach Abschluß war ein Drittel des Reaktionsgemischs mit aufgetauten kompetenten JM109-Zellen (D. Hanahan [1985] in „DNA Cloning“ [D. M. Glover], Band 1, IRL Press, Washington) vermischt und beschichtet. Einzeln herausgegriffene Kolonien wurden genutzt, um Flüssigmittel zu impfen, und die Zellen wurden zur Gewinnung von ssDNA mit dem M13K07-Hilfshagen superinfiziert. Die Sequenz der Klone wurde unter Verwendung des M13-Umkehrsequenzierungsprimers und von zwei IL-3-sequenzspezifischen Primern verifiziert (Tab. 1; 823: nt 118–137 und 824: nt 261–280).

Der Doppel-Cysteinmutant (9045) wurde durch Ligierung der entsprechenden BstBI-BamHI-Fragmente der die mutanten IL-3-Gene 904 und 905 tragenden Plasmide aufgebaut. Auf ähnliche Weise wurden die Kombinationsmutanten X und Z durch Ligierung der eine 5'-Deletion enthaltenden Fragmente und der 3'-Deletionen enthaltenden Fragmente aufgebaut. Die daraus resultierenden Klone wurden durch Restriktaseanalyse und Sequenzanalyse überprüft.

Der Mutant 9329 wurde nach HpaI- und BamHI-Aufschluß und Ligation mit den Oligonucleotiden 1424/1425 von 939 abgeleitet. Die Klone wurden zuerst auf Verlust des HpaI-Orts und danach auf korrekte DNA-Sequenz verifiziert.

Von allen Transformanten wurde Plasmid-DNA für eine zweite Runde der Transformation in JM109-Zellen isoliert, um die potentielle Kontamination mit der parentalen IL-3-Konstruktion auszuschließen. Nach der Sequenzverifikation wurden diese Klone zur Proteingewinnung verwendet.

Einige der hier beschriebenen Mutanten (811, 933 und 9329) wurden in pGB/IL-340 eingeführt. Dies erfolgte durch Ligierung des PstI-XhoI-Fragments von einem pGB/IL-339-Mutantderivat in PstI-XhoI-aufgespaltenem pGB/IL-340, was die Plasmide pGB/IL-340/811, pGB/IL-340/933 und pGB/IL-340/9329 erbrachte.

Der Aufbau von Bacillus-Expressionsvektoren für IL-3-Muteine erfolgte durch den Austausch des PstI-HindIII-Fragments von pGB/IL-322 (das einen Teil des Alpha-Amylase-Signalpeptids, die vollständige reife IL-3-cDNA-Sequenz und den Amylaseterminator trägt) mit dem PstI-HindIII-Fragment eines pGB/IL-340-Mutantderivats (das einen Teil des Alpha-Amylase-Signalpeptids, die mutante IL-3-cDNA-Sequenz und den Alpha-Amylase-Terminator trägt). Die Bacillus-Expressionsvektoren für die Muteine 811, 933 und 9329 wurden pGB/IL-322/811, pGB/IL-322/933 bzw. pGB/IL-322/9329 genannt.

Ein weiterer Mutant (1455, dem die Aminosäuren 130–133 fehlen) wurde direkt in pGB/IL-340 durch Ausschluß-Mutagenese unter Verwendung von Oligonucleotid 1455 (Tab. 1) aufgebaut, was Plasmid pGB/IL-340/1455 erbrachte. Darauf wurde die Mutantensequenz in ähnlicher Weise wie für die Mutanten 811, 933 und 9329 auf den pGB/IL-322 übertragen, was Plasmid pGB/IL-341 erbrachte.

Tabelle 1
Mutagenese-Oligonucleotide

Code	Sequenz (5' → 3')	beteiligte Aminosäuren
810	AACTGCTCTAACATG ^{..} CCTTTGCCTTTGCTG	20–30
811	CACTTAAAGCAGCCAG ^{..} AAAATAACCTTCGA	31–49
812	ATGGAAAATAACCTT ^{..} AACAGGGCTGTCAAG	54–61
813	TTCAACAGGGCTGT ^{..} CCTCCTGCCATGTCTG	66–80
820	AATCTCCTGCCATGT ^{..} GCACCCACGCGACAT	85–90
821	ACGGCCGCACCCAC ^{..} GACTGGAATGAATTC	94–102
822	GGTGACTGGAATGA ^{..} AAATGCGCAGGCTCAA	107–119
932	CGGGGATCCGTCG ^{..} ACAACCTGCTCTAACATG	1–14
933	ATAACACACTTAA ^{..} AGAACAACCTCAATGGG	29–37
934	GGGGAAGACCAAG ^{..} ACAGGCCAAACCTGGAG	47–54
935	AGGCCAAACCTGG ^{..} GAGGCATCAGCAATTGAG	60–70
936	GCATCAGCAATTG ^{..} AGTGTCTGCCCTGGCC	76–83
937	TGTCTGCCCTGG ^{..} CCCCAATCCATATCAAG	89–95
938	CATATCAAGGAC ^{..} GGTACGTTCTATCTGAAA	103–111
939	CTGAAAACCCTTG ^{..} AGGCGATCTTTTGAGTC	120–130

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Code	Sequenz (5' → 3')	beteiligte Aminosäuren
823	CCTTGAAGACAAGCTGGGTT	
824	CCAAACCTGGAGGCATTCAA	
419	TCGACGCTCCCATGACCCAGACAACGCCCTTGAAGACAAGCTGGGTT	
420	AACCCAGCTTGTCTTCAAGGGCGTTGTCTGGGTCATGGGAGCG	
731	CAGGAAACACATATGACCATGATT	
944	TGAGCCTCGCGATCTTTTACTCGAGTAGAAGAGCAGAGAGGACGG	
1055	GATCCTCTGCAGCAGCGGGCTCCCATGACCCAGACAACGCCCTTGAAG- ACAAGCTGGGTT	
1056	AACCCAGCTTGTCTTCAAGGGCGTTGTCTGGGTCATGGGAGCCGCCGCTG- CTGCAGAG	
1424	GATCCTCTGCAGCAGCGGGC	
1425	CGCCGCTGCTGCAGAG	
1455	CTCAACAGACGACTTTGAGCTGACTCGAGTAGAAGAGCAGAG	

• Zeigt das Nucleotid an, das der Deletion im IL-3-Gen am nächsten ist.

Tabelle 2

Oligonucleotide zur Substitutionsmutagenese

Code	Sequenz (5' → 3')	beteiligte Aminosäuren
904	GACAAGCTGGGTTAACGCTAGCAACATGATCGATGAA	16
905	CTTAAAAATCTCCTGCCGGCGCTGCCCCTGGCCACGG	84
1480	TTGCCTTTGCTGCGCTTCAACAACCTC	36
1481	AACCTCAATGGGAAACGCCAAGACATTCTG	43-44
1482	GGGGAAGACCAACGCATTCTGATGGAA	46
1483	GACATTCTGATGAAAAATAACCTTCGA	50
1484	GAAAATAACCTTGAAGATCCAAACCTGGAG	54-55
1485	AGGCCAAACCTGAAAGCATTCAACAGG	59
1486	GAGGCATTCAACCCGGGCGTCAAGAGTTTA	63-64
1487	GCATCAGCAATT [C/G] GTAGCATTCTTAAA	75
1488	GAGAGCATTCTTGAAAATCTCCTGCCA	79
1489	GCCGCACCCACGCCGCATCCAATCCAT	94
1490	CGACATCCAATCGAAATCGATCAGGGTACTGGAAT	98-101
1491	GGTACTGGAATAAATTCCGGAGGAAA	106
1492	TGGAATGAATTCGAAGATGAACTGACGTTCTAT	108-110
1493	AGGAAACTGACGGCGACCCTGAAAACCTT	113-114

Beispiel 3

Reinigung von IL-3-Muteinen aus *E. coli* oder *Bacillus*

E. coli-JM109-Kulturen (100ml) wurden mit 0,5ml einer frischen Übernacht-Kultur des (mutanten) IL-3-Klons geimpft und bei 37°C kultiviert, bis ein OD von 0,4-0,6 bei 550 nm erreicht war. Durch Zusatz von 1 mM IPTG (Pharmacia) wurde plasmidgerichtete Proteinsynthese induziert. Nach einer zusätzlichen Kultur über 3-16 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugierung (10 Min., 4000 U/Min. bei 4°C) gesammelt und in gefrorenem Zustand gelagert.

Die Bakterien wurden in 10 ml TE (10 mM Tris-HCl, pH 8; 1 mM EDTA) suspendiert und mit Lysozym versehen (0,025% = 500 µg/ml). Nach 30 Min. lang bei Raumtemperatur erfolgter Inkubation wurden MgCl₂ und DNase den Endkonzentrationen von 10 mM bzw. 20 µg/ml zugesetzt. Nach einer über 15 Min. andauernden Inkubation bei 37°C wurden Tween 20 (0,2%), DTT (2 mM) und PMSF (0,1 mM) zugesetzt. Die Suspension wurde auf Eis abgekühlt und nachdrücklich beschallt (zweimal 35 Sek.). Das Homogenat wurde durch Zentrifugation (30 Min. 15000 × g, 10000 U/Min. in einem Beckmann-JS13.1-Rotor) bei 4°C geklärt, der Überstand wurde abgetrennt.

Das Pellet wurde in 4 ml 55%iger Saccharose in Puffer-TPD (50 mM Tris-HCl, pH 8; 0,1 mM PMSF und 2 mM DTT) durch Beschallung resuspendiert, zur direkten Untersuchung der biologischen Aktivität in Harnstoff entweder pelletiert oder löslich gemacht oder auf einen diskontinuierlichen Saccharosegradienten geschichtet (2-ml-Portionen von 75%iger und 60%iger Saccharose in TPD-Puffer), im wesentlichen wie in WO 88/00598 beschrieben. Nach der Zentrifugierung bei 200000 × g (35000 U/Min. in einem Sorvall-TH641-Rotor) bei 25°C über zwei Stunden wurden die Einschlußkörper mit den IL-3-Proteinen aus der 75%-Saccharose-Interphase gewonnen.

Nach einer mindestens 4fachen Dilution wurden die Einschlußkörper bei 25000 × g pelletiert (30 Min. bei 13000 U/Min. im Beckman-JS13.1-Rotor) und in 5 ml 8M-Harnstoff mit 50 mM Tris-HCl pH 8,9 und 2 mM DTT beschallt und über Nacht bei 4 °C stehengelassen. Die geklärte Lösung wurde daraufhin in eine 3-ml-DEAE-Sepharose-Schnellfließkolonne (Pharmacia) eingebracht und mit 8M-Harnstoff, 50 mM Tris-HCl pH 8,9 und 1 mM DTT-Puffer äquilibriert. Das IL-3-Protein wurde an die Kolonne gebunden und mit 75 mM NaCl im gleichen Puffer stufenweise eluiert. Das eluierte Protein wurde gegen verschiedene Teile 10 mM Tris-HCl pH 8,0 und 1 mM DTT-Puffer dialysiert und durch Zusatz von 10fach konzentriertem RPMI-Zellkulturmedium (Sigma) mit 1%igem Rinderserumalbumin isotonisch gemacht. Die filtersterilisierte Lösung (0,22 µm Millex-GV, Ultrafilter) wurde zur biochemischen und biologischen Charakterisierung verwendet.

Die durch Bacillus gewonnenen Mutantproteine 811, 933, 1455, 9329 X und Z wurden in das Kulturmedium ausgeschleust und erforderten keine so gründlichen Reinigungsverfahren zur Erprobung der biologischen Aktivität. Aus diesem Grunde wurde der geklärte Überstand (1 l) (angepaßt an 5 mM EDTA, 1 mM PMSF und 1 M Ammoniumsulfat) über eine mit 1 M Ammoniumsulfat in 10 mM Tris-HCl pH 7,0 Puffer äquilibrierte, 15–20 ml umfassende Fractogel-TSK-Butyl-650-(C)-Kolonnen (Merck) geführt. Das gebundene IL-3-Protein wurde mit einem 10-mM-Tris-HCl-Puffer eluiert und danach über eine mit einem 10-mM-Tris-HCl-pH-8,0-Puffer äquilibrierte, 1,5 ml umfassende DEAE-Sepharose-Schnellfließkolonne geführt. Der Durchfluß wurde gesammelt und auf 70%iges Ammoniumsulfat eingestellt, um das IL-3-Protein zu konzentrieren. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 10000 U/Min. (JS-13-Rotor) gesammelt, aufgelöst und gegen einen 10-mM-Tris-HCl-pH-8,0-1-mM-DTT-Puffer dialysiert. Proben, die 25–100 µl der ursprünglichen Bakterienkultur entsprachen, wurden auf 0,75 × 75 × 100 mm (BioRad Minioproten II) 13,5%igen SDS-Polyacrylamidgelen (Acryl/Bisacryl=29/1) analysiert. Proteine wurden entweder durch Coomassie-Brilliantblau-G250-Färbung oder immunologische Methoden sichtbar gemacht. Abb. 4 zeigt ein Beispiel von in E. coli ausgeprägten gereinigten Muteinen.

Die Expression in E. coli von mutanten pGB/IL-339-abgeleiteten IL-3-Proteinen lag allgemein höher als das gleiche Mutantprotein aus dem pGB/IL-336-Expressionsvektor. Das angewendete Reinigungsverfahren wurde nicht geschaffen, um völlig reine IL-3-Protein-Präparate hervorzubringen. Im allgemeinen wurden auf den SDS-Gelelektrophoresen Schmutzstoffe mit leicht höherer relativer Molekülmasse beobachtet. Durch densitometrisches Scanning der beschmutzten SDS-Gele wurde die Menge des IL-3-Proteins bestimmt. Obwohl nach der Dialyse gelegentlich ernste Proteineinbußen eintraten, belief sich die gesamte Ausbeute im allgemeinen auf 0,1–1 mg „gereinigtes“ IL-3-Protein. Einzige Ausnahmen waren die Mutanten 811 und 933, die in keinem der E. coli-Expressionsvektoren Fusionsproteinergewinnung erbrachten. Die Northern-Technik ließ eine starke Reduzierung des IL-3-spezifischen RNA in den Bakterien erkennen, während im DNA-Plasmidgehalt kein signifikanter Unterschied festgestellt wurde. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß die mRNA-Stabilität wahrscheinlich durch die in der eukaryotischen IL-3-cDNA-Sequenz eingeführten Deletionen vermindert ist.

Die einzige angemessene Methode zur Synthese der Muteine 811 und 933 ist die Expression in Bacillus licheniformis. Obwohl die Menge an produziertem Protein verglichen mit der durch Bacillus-Stränge mittels Synthetisierung anderer Muteine wie 9329 und 1455 gewonnenen Proteinmenge sehr gering ist, genügt sie dennoch, um die Muteine 811 und 933 in ausreichenden Mengen zu reinigen und die hierin beschriebenen biologischen Untersuchungen durchzuführen.

Beispiel 4

Immunologische Charakterisierung der IL-3-Muteine

Die Herstellung von polyklonalen und monoklonalen Antisera wurde in WO 88/04691 beschrieben.

Zum immunologischen Nachweis von IL-3-Muteinen wurden die gelfraktionierten Proteine (siehe Beispiel 3) auf Cellulosenitrat (0,2 µm, Schleicher und Schuell BA83) übertragen, wobei das Halbtrocken-Blottingsystem (Novablot, Pharmacia/LKB) mit einem fortlaufenden Puffersystem (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,0375 % SDS und 20 % Methanol) bei 1,2 mA/cm² über einen Zeitraum von 90 Min. verwendet wurde. Der Cellulosenitratfilter wurde danach luftgetrocknet, mit einer 3%igen Rinderserumalbumin(BSA, Sigma)-Lösung vorinkubiert (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 350 mM NaCl; 0,1 % PMSF und 0,1 % Natriumazid) und 4–16 Stunden lang mit den polyklonalen (10⁻³ Dilution) oder monoklonalen (je nach Zielstellung der Experimente) Antikörpern inkubiert, und zwar gerichtet gegen Human-IL-3 (MCA A1, A4, A5, A8, A18 bei einer 10⁻⁴-Dilution) in einem RIA-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 % Triton X-100; 0,1 % SDS; 0,5 % Na-desoxycholat; 0,1 mM PMSF und 0,3 % BSA). Immunologische Komplexe wurden nach den vom Hersteller zur Verfügung gestellten Protokollen unter Verwendung biotinylierter Anti-Kaninchen- oder -Maus-Ig, streptavidinbiotinylierter Meerrettichperoxidase (Amersham International, Amersham, GB) und 4-Chlor-1-naphtol (Gibco-BRL) sichtbar gemacht. Als Alternative wurden Antiserum-Inkubationen in Tris-gepuffertem Salz plus 0,05 % Tween 20 durchgeführt. Alkaliphosphataseverbundene Anti-Maus-Ig-Komplexe wurden nach Standardprotokollen (Promega) sichtbar gemacht.

Die Daten, die zur Wechselwirkung spezifischer monoklonaler Antikörper mit hIL-3-Muteinen in Western-Technik-Experimenten gehören, sind aus Tab. 3 ersichtlich.

Tabelle 3
Bewertung der IL-3/MCA-Daten

MUTANT (AA) MCA	4810 20-30	933 29-37	811 31-49	934 47-54	812 54-61	935 60-70	4813 66-80	INSGESAMT SONSTIGE
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: Aszitesmonoklonale
 ++: vollständige Reaktion bei Western-Technik
 +: mindestens 5fach reduzierte Reaktion
 --: keine Reaktion festgestellt

Aus der Analyse der in Tab. 3 aufgeführten Ergebnisse wird deutlich, daß die Mehrheit der gegen das gelgereinigte denaturierte Fusionsprotein erhobenen monoklonalen Antikörper gegen Epitope gerichtet ist, die zwischen den Resten 30 und 50 des reifen IL-3-Polypeptids angesiedelt sind. Diese Epitope widerspiegeln zumeist lineare Polypeptidketten; es wurde lediglich ein Beispiel (13) eines diskontinuierlichen Epitops festgestellt. Die größte Gruppe ist in der Lage, den 933-Mutanten zu identifizieren, geht jedoch keine Reaktion mit dem 811-Mutanten ein. Aus diesem Grund muß das Epitop zwischen den Resten 37 und 50 liegen. Diese Region erweist sich als höchst hydrophil mit postulierter β -Schleife und α -Helix (DNASIS-Software) und wurde als Antigen determinante unter Verwendung des Hopp-und-Wood-Algorithmus vorgeschlagen. Die zweite Antikörpergruppe ist durch das Ausbleiben einer Reaktion mit Mutant 933 (dem 9 Aminosäuren fehlen) gekennzeichnet. Diese hydrophobe prolinreiche Knäuelregion wird nicht als größerer antigener Ort prognostiziert.

Eine verfeinerte Lokalisierung dieser Epitope ergibt sich aus der Reaktion der Aszitesmonoklonale mit den folgenden Substitutionsmutanten: Asp³⁶ → Arg, Gly⁴³Asp → Lys⁴³Arg und Asp⁴⁶ → Arg.

Eine weitere Charakterisierung der Aszitesmonoklonale durch Doppel-Sandwich-ELISA verwies auf fehlende Interferenz zwischen A1 und A5 oder A8 sowie zwischen A5 und A18. ELISA in der Konkurrenzreaktion zeigte eine Querkonkurrenz zwischen A1 und A18, zwischen A5 und A8 sowie zwischen A8 und A18. Keine Querkonkurrenz gab es bei A4. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit den Immunblottingexperimenten. Außerdem wurde festgestellt, daß Aszitesantikörper unabhängig vom Glykosylierungsstatus mit hIL-3-Präparaten von Säuger-, Bakterien- und Hefekulturen reagieren.

Auf der Grundlage der zusammengefaßten Informationen aus diesen immunologischen Versuchen können Epitope wie folgt lokalisiert werden:

- A1 und A18 zielen gegen ein Epitop, das zwischen den Aminosäuren 29 und 37 angesiedelt ist. Weiterhin kann aus dem 36D → R-Mutanten geschlossen werden, daß der A18-Epitop etwas stärker in Richtung des Carboxylendes als das A1-Epitop liegt.
- A5 zielt gegen ein Epitop, das zwischen den Aminosäuren 45 und 54 liegt.
- A8 zielt gegen ein Epitop, das zwischen den Aminosäuren 36 und 47 liegt.

Beispiel 5

Biologische Charakterisierung der IL-3-Muteine

Die AML-DNA-Synthese wurde auf AML193-Humanzellen getestet. AML193-Humanzellen (ATCC: CRL-9589) wurden in serumfreiem Medium (SFM) („Modified Dulbecco's Medium“ nach Iscove [Gibco BRL] mit einem Gehalt von 0,1% BSA [Behringwerke AG, Marburg] 10 µg/ml Insulin [Organon] und Transferrin, 0,1 mM β -Mercaptoethanol) und 10 bis 20 Einheiten Human-IL-3 gehalten.

Dilutionen von (mutanten) IL-3-Präparaten wurden in SMF auf runden Platten mit 96 Vertiefungen (50 µl) hergestellt. Sechs Tage lang wurden gewaschene Zellen ($1-2 \times 10^4$ in 50 µl SFM) zugesetzt und kultiviert. In 20 µl SFM wurde ^3H -Thymidin (0,1 µCi, 2 µCi/mmol) zugesetzt und die Zellen 16 Stunden später geerntet. Eine Einheit der IL-3-Aktivität wurde als die Menge bestimmt, die erforderlich ist, um bei dieser Untersuchung 50% der maximalen DNA-Synthese zu erbringen. Beim IL-3-Bezugspräparat schwankte die spezifische Aktivität zwischen 2×10^6 und 2×10^7 Einheiten pro mg Protein. Allgemein wurde die biologische Aktivität der Muteine mit diesem Bezugspräparat verglichen.

Fig. 4 zeigt ein Beispiel der AML-Proliferationsstudie, bei der Mutein 812 mit dem in *Bacillus* ausgeprägten IL-3-Bezugspräparat verglichen wird. Aus der Grafik ist ersichtlich, daß das Mutein 812 eine Aktivität aufweist, die um etwa 4 Größenordnungen – im Vergleich zum unmodifizierten IL-3 – vermindert ist. Dennoch ist das Mutein aber noch immer in der Lage, die AML-Zellen zu maximaler Aktivität zu stimulieren; dazu ist lediglich mehr Protein nötig.

Mit gereinigtem, rekombinanten hIL-3 wurde eine IL-3-Rezeptorbindungsstudie vorgenommen (siehe EP-A-0275598 und EPA 90200624.6).

IL-3 wurde mit dem Bolton-Hunter-Reagens radioaktiv markiert (wie von Budel u. a., *Blood*, 74 [1989] 565–571, beschrieben). Die spezifische Aktivität wurde auf 80000 cpm/ng des IL-3 geschätzt. Als Ziel wurden entweder Spenderleukozyten, AML-Patientenzellen oder MV4-11(ATC: CRL-9591)-Zellen verwendet. Die Zellen wurden in Kombinationssalzlösung nach Hanks gewaschen und in Alpha-MEM plus 1% BSA suspendiert. In der Regel wurden $3-10 \times 10^6$ Zellen mit 200–300 pM radioaktiv markiertem IL-3 und verschiedenen Konzentrationen nichtmarkierten Mutantproteins in einem Gesamtvolumen von 200 µl eine Stunde lang bei 37°C inkubiert. Zellgebundenes, markiertes IL-3 wurde 10 Minuten lang zu $1000 \times g$ bei 4°C durch ein 0,5-ml-Polster Kälberserum in einer Eppendorf-Röhre zentrifugiert (Budel u. a., 1989). Die Röhren wurden in Flüssigstickstoff gefroren, und die Enden wurden zur Zählung in einem Packard-Gammazähler abgeschnitten. Es wurde die Konkurrenzbindung gegenüber dem Bezugspräparat bestimmt. Fig. 5 zeigt ein Beispiel eines IL-3-Rezeptorbindungsexperiments. Radioaktiv markierte IL-3-Bindung an AML-Patientenzellen wird mit nichtmarkiertem IL-3-Protein (Bezugspräparat) konkurrenzreagiert. Aufgrund der geringen Anzahl von Rezeptoren (unter 200) auf den Zielzellen schwankten die Konkurrenzdaten zumeist um eine Größenordnung.

In Tab. 4 werden die Ergebnisse aus obigen Untersuchungen zu spezifizierten Deletions- und Substitutionsmutanten dargelegt. Ein Teil der Ergebnisse ist auch in Fig. 6 grafisch wiedergegeben.

Es zeigte sich, daß IL-3-Fusionsproteine, die sowohl von pGB/IL-336- als auch von pGB/IL-339-Expressionsplasmiden abstammen, in der biologischen Aktivität identisch waren und sich vom aus der Expression der ungekürzten IL-3-cDNA in pGB/IL-322 abgeleiteten *B. licheniformis*-Bezugspräparat nicht signifikant unterschieden (siehe EPA 89201967.0). Offensichtlich geht vom heterologen Leader-Peptid in den *E. coli*-Fusionsproteinen keine negative Wirkung auf die biologische Aktivität aus. Die meisten IL-3-Deletionsmutanten waren bei der biologischen Aktivität wesentlich vermindert. Deletionen zwischen den Aminosäuren 50 und 105 führten zu einer mehr als 1000fachen Reduzierung der spezifischen Aktivität. In allen Fällen wurde jedoch biologische Restaktivität festgestellt, was auf die Sensitivität des Biotests sowie das Fehlen toxischer Komponenten in den Proteinpräparaten hinweist. Eine vollständige Wiederherstellung der biologischen Aktivität wurde für die Deletionsmutanten 932 (1–14) und 939 (120–130) und den entsprechenden Doppelmutanten 9329 sowie den C-terminalen Mutanten 1455 verzeichnet. Die deletierten N- und C-terminalen Sequenzen sind offensichtlich nicht an der Bindung an den Rezeptor oder an der angemessenen Faltung des Moleküls beteiligt. Im Gegensatz dazu führten Einzelsubstitutionen der Cystein-Reste (Mutanten 904 und 905) zu einer 5000fachen Verminderung der biologischen Aktivität. Ähnliche Wirkungen wurden bei einem Cystein-Doppelmutanten (9045) festgestellt, was darauf hinweist, daß die S-S-Brücke beim natürlichen IL-3-Molekül eine wichtige stabilisierende Rolle spielt.

Bei den in *E. coli* ausgeprägten Muteinen, die im vorstehenden Abschnitt beschrieben wurden, handelt es sich durchweg um Fusionsproteine. Um den Nachweis zu führen, daß die zusätzlichen N-terminalen Aminosäuren als Kompensation für den Verlust von deletierten IL-3-Spezialaminosäuren nicht erforderlich sind, wurde der Aufbau pGB/IL-322/9329 vorgenommen und in *B. licheniformis* ausgeprägt. Dieser Aufbau resultiert in einem 1–14/120–130 IL-3-Mutein ohne zusätzliche Aminosäuren am Aminoende. Die Aktivität dieses Muteins ist mit dem Wildtyp-Molekül vergleichbar und beweist, daß nur die restlichen 108 Aminosäuren für die IL-3-Aktivität verantwortlich sind.

Bestimmt wurde die Rezeptorbindung der meisten mutanten IL-3-Proteine. Die Bindungsexperimente gestatten keinen ausführlichen Vergleich der Rezeptorbindungsaktivität aufgrund der niedrigen Rezeptorzahlen auf den Zielzellen. Insgesamt besteht aber eine gute Korrelation zwischen biologischer Aktivität und Rezeptorbindung (Tab. 4). Für die meisten mutanten IL-3-Proteine liegt das Verhältnis zwischen relativer Bindung und biologischer Aktivität annähernd bei 1. Die Muteine 1483, 1488, 904 und 9045 weisen beträchtlich höhere Relationen auf (Tab. 4 und Fig. 6), was auf eine potentielle antagonistische Aktivität hindeutet. Das bedeutet, daß diese Moleküle als Teilantagonisten von IL-3 betrachtet werden können. Nach weiteren Experimenten können Muteine gefunden werden, die über die gleiche Bindungskapazität wie das natürliche IL-3, jedoch eine 10^4 -fache geringere Aktivität verfügen. Diese Moleküle wären echte Antagonisten von IL-3. Das erfindungsgemäß beschriebene Herangehen bietet die Mittel und Methoden, um solche Moleküle zu erhalten.

Tabelle 4
Biologische Aktivitäten von IL-3-Mutanten

MUTAN- TENCODE	AMINOSÄURE- DELETION ODER -SUBSTITUTION ¹	RELATIVE SPEZ. BIOLOGISCHE AKTIVITÄT ²	RELATIVES ANTAGONIST. POTENTIAL ³
Ref.		1,0	
pGB/IL-339		$3,7 \times 10^{-1}$	
pGB/IL-336		$7,9 \times 10^{-1}$	1,1 (0,2-3,3)
932	1-14	$7,1 \times 10^{-1}$	2,8 (0,6-4,9)
810	20-30	$2,1 \times 10^{-3}$	2,4
934	47-54	$7,3 \times 10^{-5}$	N.C.
812	54-61	$5,3 \times 10^{-5}$	1,2 (0,9-1,4)
935	60-70	$1,2 \times 10^{-5}$	N.C.
813	66-80	$2,4 \times 10^{-5}$	N.C.
936	76-83	$6,4 \times 10^{-6}$	N.C.
820	85-90	$1,1 \times 10^{-5}$	N.C.
937	89-95	$1,0 \times 10^{-5}$	N.C.
821	94-102	$1,8 \times 10^{-5}$	N.C.
938	103-111	$6,6 \times 10^{-5}$	N.C.
822	107-119	$2,1 \times 10^{-4}$	1,9 (0,6-3,9)
939	120-130	2,0	1,8 (0,3-2,8)
9329	1-14/120-130	$4,0 \times 10^{-1}$	2,0 (1,8-2,1)
904	16C → A	$2,4 \times 10^{-4}$	100 (33-210)
905	84C → A	$1,9 \times 10^{-4}$	11 (4,8-38)
9045	16/84C → A	$3,1 \times 10^{-4}$	88 (13-170)
1480*	36D → R	$3,1 \times 10^{-3}$	12
1481	43ED → KR	$< 1,5 \times 10^{-4}$	N.C.
1482*	46D → R	$7,5 \times 10^{-3}$	0,6
1483	50E → K	$2,7 \times 10^{-3}$	37 (4-67)
1484	54RR → ED	$8,0 \times 10^{-5}$	3,5 (2,3-4,7)
1485*	59E → K	$1,1 \times 10^{-2}$	3
1486	63RA → PG	$9,8 \times 10^{-5}$	14 (3,5-27)
1487A*	75E → G	$1,5 \times 10^{-2}$	3
1487B*	75E → R	$8,6 \times 10^{-3}$	3
1488	79K → E	$1,9 \times 10^{-3}$	65 (54-77)
1489	94R → P	$1,7 \times 10^{-3} §$	N.C.
1490*	98HIKD → EIKQ	$2,2 \times 10^{-3}$	5
1491*	106E → K	$3,2 \times 10^{-4}$	6
1492	108RRK → EDE	$3,1 \times 10^{-5}$	2 (1,2-3)
1493	113FY → AT	$< 1,2 \times 10^{-5}$	N.C.
X#	1-14/120-133	$2,3 \times 10^{-1}$	8,9 (3,6-14)
Z#	1-14/116-133	$1,1 \times 10^{-1} §$	1,6 (1-1,9)
933#	29-37	$5,7 \times 10^{-3} §$	1,1 (0,2-2,9)
811#	31-49	$4,8 \times 10^{-3} §$	1,6 (0,5-3,2)

1 Angegeben wird die Deletion zwischen den Aminosäurezahlen des reifen Human-IL-3. Substitutionen von Aminosäuren werden in einem Einzelbuchstaben-Code angegeben.

2 Die mittlere spezifische biologische Aktivität wird im Verhältnis zu den IL-3-Bezugspräparaten ausgedrückt.

3 Das antagonistische Potential wird als relative Rezeptorbindungsaktivität, geteilt durch die relative biologische Aktivität, angegeben. Die Variationsbreite wird in Klammern angegeben.

+ Einschlußkörper werden aus Saccharoselösungen pelletiert und in Harnstoff löslich gemacht. Muteine wurden in einem Medium verdünnt und auf biologische Aktivität getestet. Rezeptorbindungsexperimente wurden einmal vorgenommen.

Mutantproteine wurden in Bacillus ausgeprägt und sind durch das Fehlen einer Leader-Polypeptidsequenz gekennzeichnet.

§ Die Muteinproteinkonzentration war für das densitometrische Scanning zu niedrig und wurde auf der Grundlage von Gelen und Western-Technik geschätzt.

N.C. Für das spezielle Muteinpräparat wurde keine Konkurrenzreaktion festgestellt.

Alle Publikationen (inkl. Patente und Patentanmeldungen), die in der vorliegenden Spezifikation erwähnt werden, widerspiegeln den Grad der Sachkenntnis der Fachleute, für die diese Erfindung bestimmt ist. Alle Publikationen sind durch Verweis im gleichen Maße einbezogen, als wäre jede einzelne Publikation spezifisch und individuell durch Verweis einbezogen.

Obwohl die vorstehende Erfindung in gewisser Ausführlichkeit durch Illustration und Beispiel zum Zwecke besseren Verständnisses dargelegt wurde, dürfte dem Fachmann klar sein, daß zahlreiche Veränderungen und Modifizierungen vorgenommen werden können, ohne vom Grundgedanken oder Anwendungsgebiet der beigefügten Ansprüche abzuweichen.

Figur 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 AAC CGA 576

577  ATT CCC GGG GAT CTA AAC TT

```

Figur 2

```

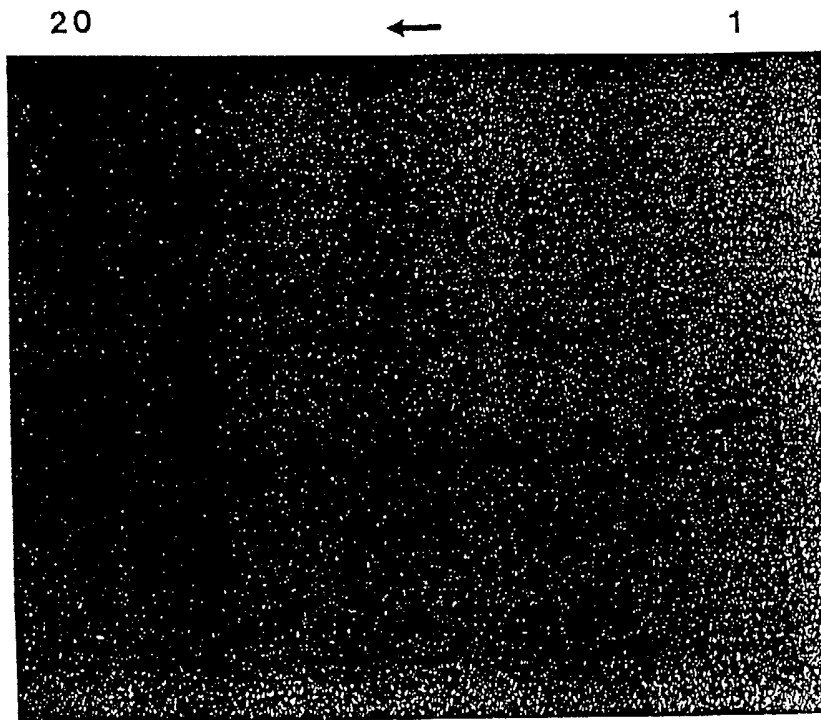
          5'
-15 met thr met ile thr asn ser arg gly ser ser ala ala ala ala Ala 1
  1  ATG ACC ATG ATT ACG AAT TCC CGG GGA TCC TCT GCA GCA GCG GCG GCT 48

... ..

          3'
130 Leu Ala Ile Phe ***
433 CTC GCG ATC TTT TGA CTC GAG TAG AAG AGA AGA GAA TC

```

Figur 3



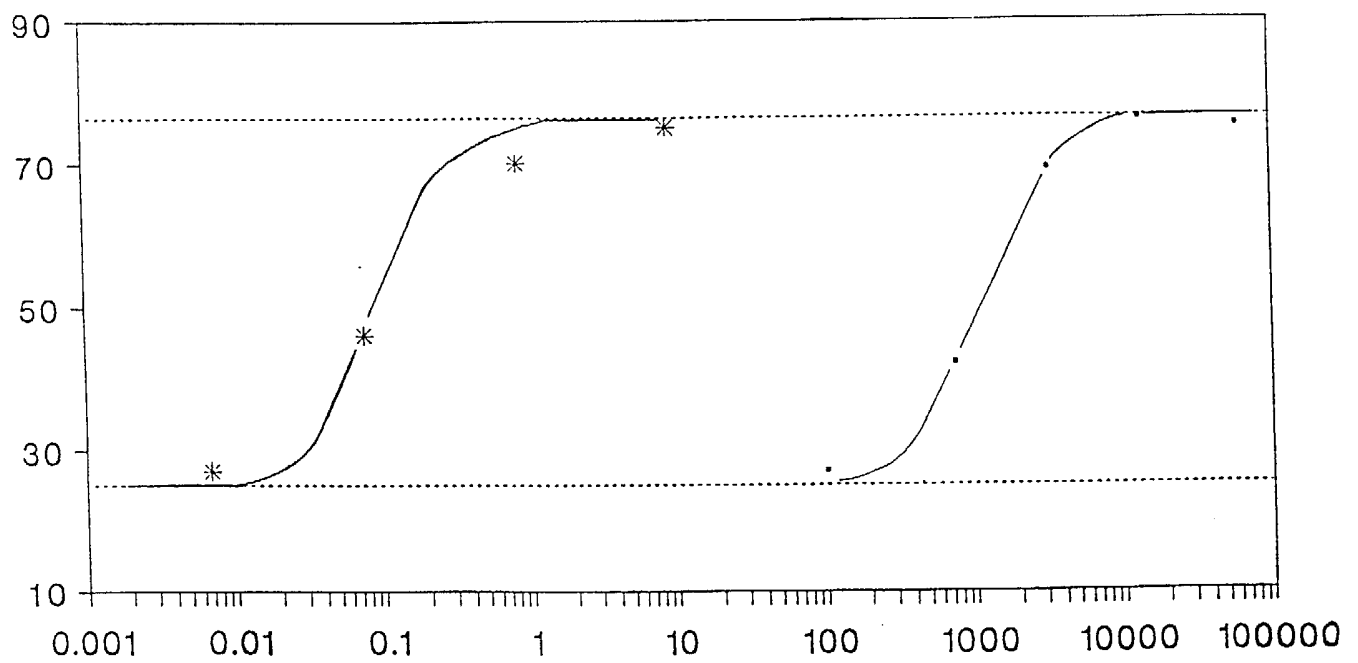
Figur 4
AML-Proliferationsstudie

in 1000 cpm

Konzentration (ng/ml)

. 812

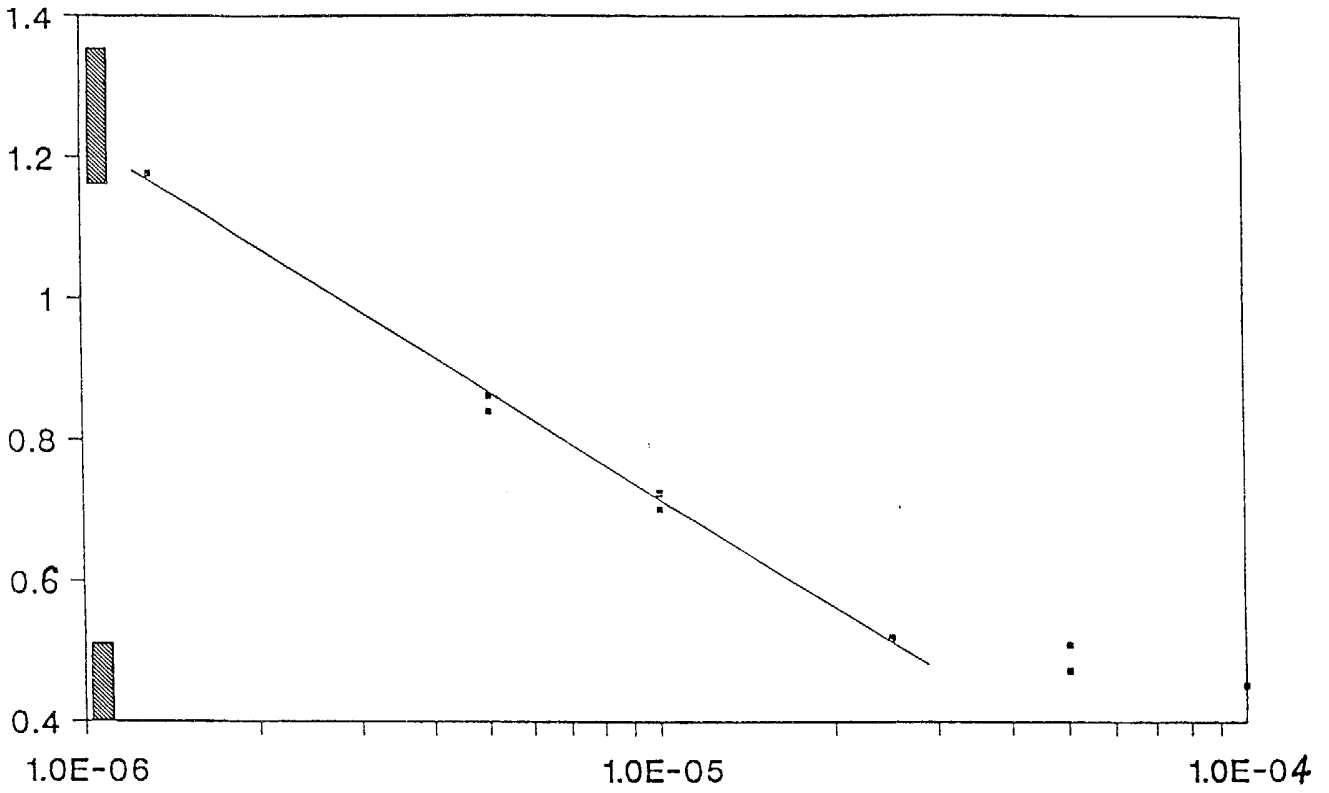
* Bezugsgröße



Figur 5
IL-3-Rezeptorbindungsstudie

in 1000 cpm, gebunden

Konzentration von nichtmarkiertem IL-3 (mg/ml)



Figur 6
Aktivitäten der IL-3-Mutanten

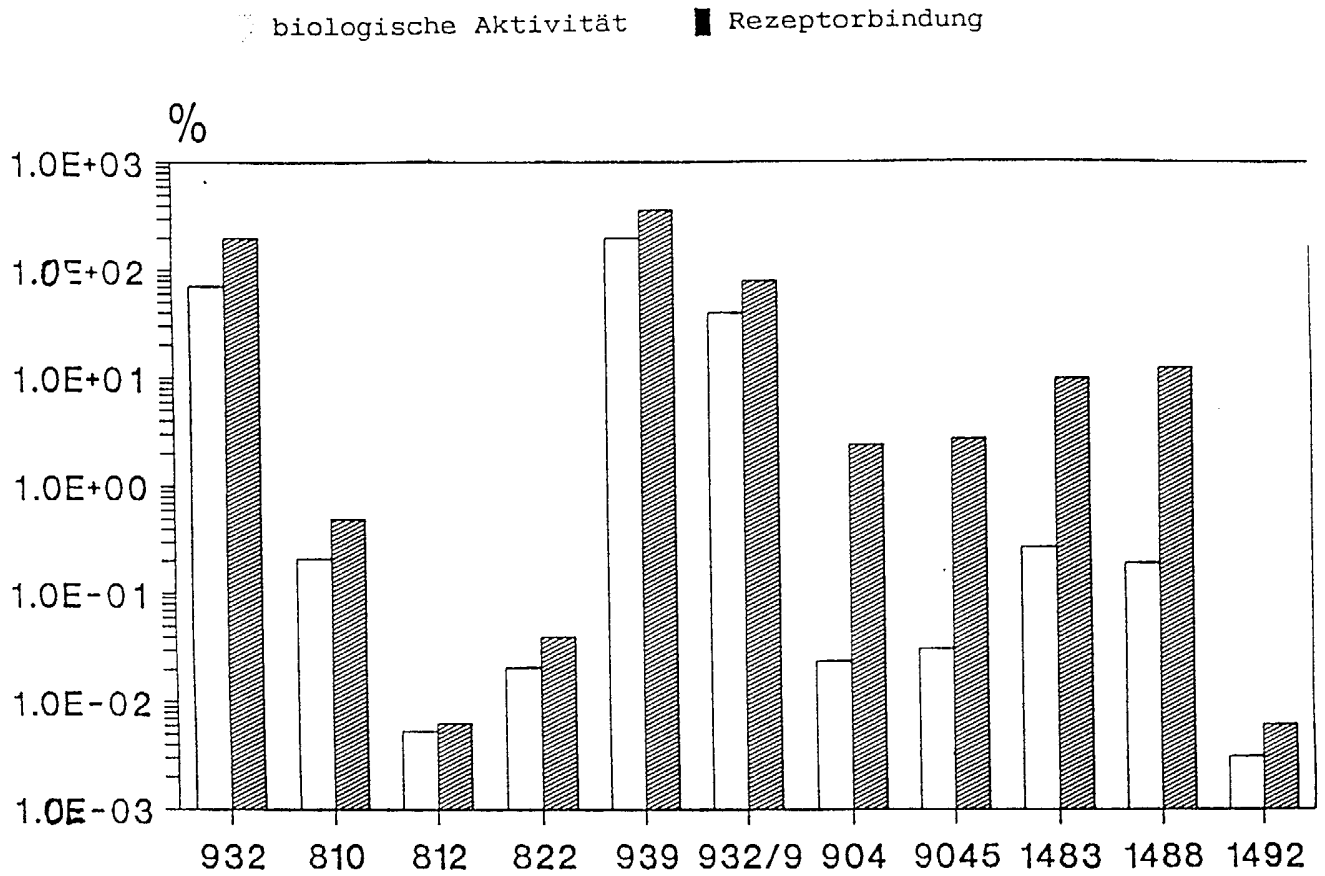


Tabelle 1
Mutagenese Oligonucleotide

Code	Sequenz	beteiligte Aminosäuren
810	AACTGCTCTAACATGCCTTTGCCTTTGCTG	20-30
811	CACTTAAAGCAGCCAGAAAATAACCTTCGA	31-49
812	ATGGAAAATAACCTTAACAGGGCTGTCAAG	54-61
813	TTCAACAGGGCTGTCCTCCTGCCATGTCTG	66-80
820	AATCTCCTGCCATGTGCACCCACGCGACAT	85-90
821	ACGGCCGCACCCACGGACTGGAATGAATTC	94-102
822	GGTGACTGGAATGAAAATGCGCAGGCTCAA	107-119
932	CGGGGATCCGTCGACAACTGCTCTAACATG	1-14
933	ATAACACACTTAAAGAACAACCTCAATGGG	29-37
934	GGGGAAGACCAAGACAGGCCAACCTGGAG	47-54
935	AGGCCAACCTGGAGGCATCAGCAATTGAG	60-70

Tabelle 1 (Fortsetzung)
Mutagenese Oligonucleotide

Code	Sequenz	beteiligte Aminosäuren
936	GCATCAGCAATTGAGTGTCTGCCCCTGGCC	76-83
937	TGTCTGCCCCTGGCCCAATCCATATCAAG	89-95
938	CATATCAAGGACGGTACGTTCTATCTGAAA	103-111
939	CTGAAAACCCTTGAGGCGATCTTTTGAGTC	120-130
823	CCTTGAAGACAAGCTGGGTT	
824	CCAAACCTGGAGGCATTCAA	
419	TCGACGCTCCCATGACCCAGACAACGCCCTTGAAGACAAGCTGGGTT	
420	AACCCAGCTTGTCTTCAAGGGCGTTGTCTGGGTCATGGGAGCG	
731	CAGGAAACACATATGACCATGATT	
944	TGAGCCTCGCGATCTTTTGACTCGAGTAGAAGAGCAGAGAGGACGG	
1055	GATCCTCTGCAGCAGCGGCGGCTCCCATGACCCAGACAACGCCCTTGAAG- ACAAGCTGGGTT	
1056	AACCCAGCTTGTCTTCAAGGGCGTTGTCTGGGTCATGGGAGCCGCGCTG- CTGCAGAG	
1424	GATCCTCTGCAGCAGCGGCG	
1425	CGCCGCTGCTGCAGAG	
1455	CTCAACAGACGACTTTGAGCTGACTCGAGTAGAAGAGCAGAG	

• Zeigt Nucleotid an, das der Deletion im IL-3-Gen am nächsten liegt.

Tabelle 2
Oligonucleotide zur Substitutionsmutagenese

Code	Sequenz	beteiligte Aminosäuren
904	GACAAGCTGGGTTAACGCTAGCAACATGATCGATGAA	16
905	CTTAAAAATCTCCTGCCGGCGCTGCCCCTGGCCACGG	84
1480	TTGCCTTTGCTGCGCTTCAACAACCTC	36
1481	AACCTCAATGGGAAACGCCAAGACATTCTG	43-44
1482	GGGAAGACCAACGCATTCTGATGGAA	46
1483	GACATTCTGATGAAAAATAACCTTCGA	50
1484	GAAAATAACCTTGAAGATCCAAACCTGGAG	54-55
1485	AGGCCAAACCTGAAAGCATTCAACAGG	59
1486	GAGGCATTCAACCCGGGCGTCAAGAGTTTA	63-64
1487	GCATCAGCAATT [C/G] GTAGCATTCTTAAA	75
1488	GAGAGCATTCTTGAAAATCTCCTGCCA	79
1489	- GCCGCACCCACGCCGCATCCAATCCAT	94
1490	CGACATCCAATCGAAATCGATCAGGGTACTGGAAT	98-101
1491	GGTACTGGAATAAATTCCGGAGGAAA	106
1492	TGGAATGAATTCTGAAGATGAACTGACGTTCTAT	108-110
1493	AGGAAACTGACGGCGACCCTGAAAACCCTT	113-114

Tabelle 3
Bewertung der IL-3/MCA-Daten

MUTANT (AA) MCA	4810 20-30	933 29-37	811 31-49	934 47-54	812 54-61	935 60-70	4813 66-80	INSGESAMT SONSTIGE
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: Aszitesmonoklonale
 ++: vollständige Reaktion bei Western-Technik
 +: mindestens 5fach reduzierte Reaktion
 --: keine Reaktion festgestellt

Tabelle 4
Biologische Aktivitäten von IL-3-Mutanten

MUTAN- TENCODE	AMINOSÄURE- DELETION ODER -SUBSTITUTION ¹	RELATIVE SPEZ. BIOLOGISCHE AKTIVITÄT ²	RELATIVES ANTAGONIST. POTENTIAL ³
Ref.		1,0	
pGB/IL-339		$3,7 \times 10^{-1}$	
pGB/IL-336		$7,9 \times 10^{-1}$	1,1 (0,2-3,3)
932	1-14	$7,1 \times 10^{-1}$	2,8 (0,6-4,9)
810	20-30	$2,1 \times 10^{-3}$	2,4
934	47-54	$7,3 \times 10^{-5}$	N.C.
812	54-61	$5,3 \times 10^{-5}$	1,2 (0,9-1,4)
935	60-70	$1,2 \times 10^{-5}$	N.C.
813	66-80	$2,4 \times 10^{-6}$	N.C.
936	76-83	$6,4 \times 10^{-6}$	N.C.
820	85-90	$1,1 \times 10^{-6}$	N.C.
937	89-95	$1,0 \times 10^{-6}$	N.C.
821	94-102	$1,8 \times 10^{-6}$	N.C.
938	103-111	$6,6 \times 10^{-6}$	N.C.
822	107-119	$2,1 \times 10^{-4}$	1,9 (0,6-3,9)
939	120-130	2,0	1,8 (0,3-2,8)
9329	1-14/120-130	$4,0 \times 10^{-1}$	2,0 (1,8-2,1)
904	16C → A	$2,4 \times 10^{-4}$	100 (33-210)
905	84C → A	$1,9 \times 10^{-4}$	11 (4,8-38)
9045	16/84C → A	$3,1 \times 10^{-4}$	88 (13-170)
1480*	36D → R	$3,1 \times 10^{-3}$	12
1481	43ED → KR	$< 1,5 \times 10^{-4}$	N.C.
1482*	46D → R	$7,5 \times 10^{-3}$	0,6
1483	50E → K	$2,7 \times 10^{-3}$	37 (4-67)
1484	54RR → ED	$8,0 \times 10^{-6}$	3,5 (2,3-4,7)
1485*	59E → K	$1,1 \times 10^{-2}$	3
1486	63RA → PG	$9,8 \times 10^{-6}$	14 (3,5-27)
1487A*	75E → G	$1,5 \times 10^{-2}$	3
1487B*	75E → R	$8,6 \times 10^{-3}$	3
1488	79K → E	$1,9 \times 10^{-3}$	65 (54-77)
1489	94R → P	$1,7 \times 10^{-3} \S$	N.C.
1490*	98HIKD → EIKQ	$2,2 \times 10^{-3}$	5
1491*	106E → K	$3,2 \times 10^{-4}$	6
1492	108RRK → EDE	$3,1 \times 10^{-6}$	2 (1,2-3)
1493	113FY → AT	$< 1,2 \times 10^{-6}$	N.C.
X#	2-14/120-133	$2,3 \times 10^{-1}$	8,9 (3,6-14)
Z#	1-14/116-133	$1,1 \times 10^{-1} \S$	1,6 (1-1,9)
933#	29-37	$5,7 \times 10^{-3} \S$	1,1 (0,2-2,9)
811#	31-49	$4,8 \times 10^{-3} \S$	1,6 (0,5-3,2)