

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 4350/83

(51) Int.Cl.⁵ : C12N 15/26
C07H 21/04, C12N 5/10, C12P 21/00,
//(C12N 5/10, C12R 1:19)

(22) Anmeldetag: 14.12.1983

(42) Beginn der Patentdauer: 15. 7.1990

(45) Ausgabetag: 25. 1.1991

(30) Priorität:

15.12.1982 JP 219518/82 beansprucht.
24.12.1982 JP 229619/82 beansprucht.
27.12.1982 JP 234607/82 beansprucht.
29.12.1982 JP 230371/82 beansprucht.
3. 2.1983 EP 83101035 beansprucht.

(73) Patentinhaber:

AJINOMOTO CO., INC.
TOKYO (JP).
JAPANESE FOUNDATION FOR CANCER RESEARCH
TOKYO (JP).

(54) DAS POLYPEPTID INTERLEUKIN-2 KODIERENDES GEN, REKOMBINANTE, DIESES GEN ENTHALTENDE DNA, DIESE REKOMBINANTE DNA AUFWEISENDE ZELLINIEN UND VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON INTERLEUKIN-2 UNTER VERWENDUNG DER GENANNTEN ZELLEN

(57) Eine DNA-Sequenz, die für ein Polypeptid mit der Aktivität von Human-Interleukin-2 kodiert, wird zur Verfügung gestellt. Diese DNA-Sequenz kann in eine Vektor-DNA inseriert werden, die zur Replikation in einer Prokaryoten- oder Eukaryoten-Zelle befähigt ist, und die durch Rekombination erhaltene DNA eignet sich zur Transformation einer Zelllinie, durch deren Kultivation dann Interleukin-2 produziert wird. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung von Interleukin-2 mit Hilfe einer derart transformierten Zelle.

AT 392 082 B

Die Erfindung bezieht sich auf eine DNA-Sequenz, die eine kodierende Sequenz aufweist, welche für Human-Interleukin-2-Polypeptid kodiert, rekombinante DNA, welche diese DNA-Sequenz enthält, eine lebende Zelllinie, welche die rekombinante DNA besitzt, und ein Verfahren zur Herstellung von Interleukin-2 unter Verwendung der Zelllinie.

5 Interleukin-2 (nachstehend auch als "IL-2" abgekürzt), das früher als T-Zellwachstumsfaktor bezeichnet wurde, ist ein lösliches Protein (im allgemeinen bekannt als "Lymphokin"), das von mit einem Lectin oder einem Antigen aktivierten T-Zellen gebildet wird; D. A. Morgan et al., Science, Bd. 193 (1976), S. 1007-1008, S. Gillis et al., J. Immunol., Bd. 120 (1978), S. 2027-2033. Interleukin 2 (IL-2) ist in der Lage, die Lymphozytenreaktivität zu regulieren und die in vitro-Langzeitkultur von antigenspezifischen Effektor-T-
10 Lymphozyten zu fördern; S. Gillis et al., Nature, Bd. 268 (1977), S. 154-156. Ferner weist IL-2 auch andere bedeutende biologische Wirkungen auf, wie eine Verstärkung der Thymozytenmitogenese (B. M. Chen et al., Cell. Immunol., Bd. 22 (1977), S. 211-224, J. Shaw et al., J. Immunol., Bd. 120 (1978), S. 1967-1973), Induktion der zytotoxischen T-Zellreaktivität (Wagner et al., Nature, Bd. 284 (1980), S. 278-280) und anti-SRBC-plaquebildende Zellreaktionen (S. Gillis et al., J. Exp. Med. Bd. 149 (1979), S. 1960-1968) in Kulturen von nackten Mäusemilzzellen. Demzufolge eignet sich diese lymphozytenregulatorische Substanz zur Verstärkung der humoralen und zellulären Immunreaktionen und zur Behebung von immundefizitären Zuständen zu einem normalen humoralen und zellulären Immunzustand. Diese bekannten immunologischen Aktivitäten von IL-2 geben einen starken Hinweis darauf, daß IL-2 einen wertvollen Arzneistoff zur Immunotherapie gegen immunologische Störungen unter Einschluß von neoplastischen Erkrankungen, bakteriellen oder viralen
20 Infektionen, Immunodefiziterkrankungen, Autoimmunerkrankungen und dergleichen darstellt; B. Papermaster et al., Adv. Immunopharm., (1980), S. 507. Wie bei Interferonen wurde bei IL-2 nachgewiesen, daß es die natürliche Killerzellaktivität erhöht, was eine mögliche Verwendung bei der Behandlung von neoplastischen Erkrankungen nahelegt. Ferner ermöglicht IL-2 die Aufrechterhaltung von Kulturen von funktionellen, monoklonalen T-Zellen und scheint damit eine Schlüsselrolle bei der Untersuchung der molekularen Natur der T-Zelldifferenzierung und des Mechanismus der differenzierten T-Zellfunktion sowie des Mechanismus der T-Zellantigenrezeptoren zu spielen. Es eignet sich auch bei der Langzeitzüchtung von monoklonalen T-Zellen zur Bildung von vielen anderen von T-Zellen abgeleiteten Lymphokinen, die sich auf einer Reihe von Gebieten als wertvoll erweisen. Ferner können die IL-2-Bildung und die Reaktion von Lymphozyten auf IL-2 wichtige Parameter immunologischer Funktionen darstellen, die bei der klinischen Diagnose von Immunitätsabweichungen wertvoll sind.

IL-2 wurde bisher durch Stimulierung von Mäuse-, Ratten-, oder Humanlymphozyten mit einem Mitogen gebildet; S. Gillis et al., Nature, Bd. 268 (1977), S. 154-156, J. Farrar et al., J. Immunol., Bd. 121 (1978), S. 1353-1360, S. Gillis et al., J. Immunol., Bd. 120 (1978), S. 2027-2033. S. Gillis et al., J. Immunol., Bd. 124 (1980), S. 1954-1962 stimulierten, humane, periphere, mononukleare Blutlymphozyten mit einem Mitogen. Ferner berichteten S. Gillis et al., J. Immunol., Bd. 125 (1980), S. 2570-2578 über die Bildung von Mäuse-IL-2 aus Mäuse-T-Zelllymphom-Zelllinien und über die Bildung von Human-IL-2 aus humanen Leukämiezelllinien (S. Gillis et al., J. Exp. Med., Bd. 152 (1980), S. 1709-1719).

Die vorerwähnten Arbeiten von Gillis et al. erörtern das Verfahren der Bildung von Human-IL-2 aus mitogenstimulierten Human-T-Zellen-Leukämiezelllinien durch Zellkulturverfahren. Jedoch führt diese Technik zu unerwünscht niedrigen Konzentrationen an Human-IL-2 und erfordert selbst zur Bildung von geringen Mengen an IL-2 aus großen Volumina an Kulturmedien komplizierte Reinigungsverfahren. Da außerdem Human-T-Zellen-Leukämiezelllinien Spuren Mengen an vielen anderen biologisch aktiven Substanzen, die analog zu Human-IL-2 sind, bilden, treten bei der Abtrennung von IL-2 von diesen anderen immunologisch aktiven Molekülen oder bei der Abtrennung von IL-2 von gelegentlich vorhandenen toxischen Lectinen beträchtliche Schwierigkeiten auf.

45 Durch Stimulation einer Mäuse-T-Lymphomazelllinie, Variante IL-4, und Extraktion der stimulierten Zellen wurde RNA erhalten, die in Oozyten von *Xenopus laevis* translatiert werden konnten. Aufgrund der Injektion synthetisieren die Oozyten ein Material mit den biologischen und biochemischen Eigenschaften von Mäuse-IL-2 (R. C. Bleackley et al., The Journal of Immunology (1981), Band 127, Seiten 2432 - 2435).

Es wäre wünschenswert, rekombinante DNA-Techniken (DNA ist eine Abkürzung für Desoxyribonucleinsäure) wie sie bei der Bildung von anderen biologisch aktiven Humanproteinen eingesetzt werden, z. B. bei Interferonen (P. W. Gray et al., Nature, Bd. 295 (1981), S. 503-508, S. Nagata et al., Nature, Bd. 284 (1980), S. 316-320, T. Taniguchi et al., Gene, Bd. 10 (1980), Seiten 11-15) zur Produktion von IL-2 einzusetzen. Jedoch waren bisherige Versuche zur Bildung von IL-2 durch rekombinante DNA-Techniken nicht erfolgreich. Beispielsweise wird in NIKKEI BIOTECHNOLOGY (Japan), Nr. 19, 5. Juli 1982 berichtet, daß
55 Versuche zum Aufbau von IL-2-bildenden Organismen durch rekombinante DNA-Techniken erfolglos waren, was vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen ist, daß das für das IL-2-Polypeptid kodierende Gen noch nicht geklont worden war.

Die europäische Patentanmeldung EP-A-0 088 195 bezieht sich auf eine m-RNA mit einem Sedimentationskoeffizienten von 8 s bis 15 s, welche in dem Oozytensystem von *Xenopus laevis* zu einem Polypeptid mit der Aktivität von Human-Interleukin-2 translatiert wird.

60 Das durch die vorliegende Erfindung zu lösende Problem besteht darin, eine für Interleukin-2 kodierende DNA-Sequenz sowie eine rekombinante DNA zur Verfügung zu stellen, welche dieses Gen enthält. Erfindungsgemäß

sollen außerdem lebende Zelllinien, welche diese rekombinant erzeugte DNA enthalten, und ein Verfahren zur Herstellung von Interleukin-2 unter Verwendung dieser Zelllinien zur Verfügung gestellt werden.

Gegenstand der Erfindung ist demnach eine DNA-Sequenz, die eine DNA-Sequenz umfaßt, welche für ein Polypeptid mit der Aktivität von menschlichem Interleukin-2 kodiert, wobei dieses Polypeptid aus der

5

a) ein Polypeptid, das die nachstehende Aminosäuresequenz aufweist:

1
 Met-Tyr-Arg-Met-Gln-Leu-Leu-Ser-Cys-Ile-Ala-Leu-Ser-Leu-
 10 20
 Ala-Leu-Val-Thr-Asn-Ser-Ala-Pro-Thr-Ser-Ser-Ser-Thr-Lys-
 Lys-Thr-Gln-Leu-Gln-Leu-Glu-His-Leu-Leu-Leu-Asp-Leu-Gln-
 Met-Ile-Leu-Asn-Gly-Ile-Asn-Asn-Tyr-Lys-Asn-Pro-Lys-Leu-
 15 Thr-Arg-Met-Leu-Thr-Phe-Lys-Phe-Tyr-Met-Pro-Lys-Lys-Ala-
 Thr-Glu-Leu-Lys-His-Leu-Gln-Cys-Leu-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-
 Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-Ala-Gln-Ser-Lys-Asn-Phe-
 His-Leu-Arg-Pro-Arg-Asp-Leu-Ile-Ser-Asn-Ile-Asn-Val-Ile-
 Val-Leu-Glu-Leu-Lys-Gly-Ser-Glu-Thr-Thr-Phe-Met-Cys-Glu-
 Tyr-Ala-Asp-Glu-Thr-Ala-Thr-Ile-Val-Glu-Phe-Leu-Asn-Arg-
 20 153
 Trp-Ile-Thr-Phe-Cys-Gln-Ser-Ile-Ile-Ser-Thr-Leu-Thr

b) ein Polypeptid, dem gegenüber (a) eine oder mehrere Aminosäuren fehlen;

c) ein Polypeptid, in dem gegenüber (a) eine oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht sind;

25

d) ein Fusions-Polypeptid, welches ein Polypeptid gemäß (a), (b) oder (c) enthält, in welchem die zusätzlich verknüpften Aminosäuren die biologische Interleukin-2-Aktivität nicht stören oder leicht eliminiert werden können,

e) ein Polypeptid, welches ein allelisches Derivat eines Polypeptids gemäß (a) darstellt.

Die Erfindung betrifft außerdem eine DNA-Sequenz, die eine DNA-Sequenz umfaßt, welche für ein Polypeptid mit der Aktivität von menschlichem Interleukin-2 kodiert, wobei das kodierte Polypeptid ausgewählt ist unter

30

(a) einem Polypeptid mit der nachstehenden Aminosäuresequenz:

X-Thr-Ser-Ser-Ser-Thr-Lys-Lys-Thr-Gln-Leu-Gln-Leu-Glu-
 His-Leu-Leu-Leu-Asp-Leu-Gln-Met-Ile-Leu-Asn-Gly-Ile-Asn-
 35 Asn-Tyr-Lys-Asn-Pro-Lys-Leu-Thr-Arg-Met-Leu-Thr-Phe-Lys-
 Phe-Tyr-Met-Pro-Lys-Lys-Ala-Thr-Glu-Leu-Lys-His-Leu-Gln-
 Cys-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-
 Leu-Ala-Gln-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Arg-Pro-Arg-Asp-Leu-
 Ile-Ser-Asn-Ile-Asn-Val-Ile-Val-Leu-Glu-Leu-Lys-Gly-Ser-
 40 Glu-Thr-Thr-Phe-Met-Cys-Glu-Tyr-Ala-Asp-Glu-Thr-Ala-Thr-
 Ile-Val-Glu-Phe-Leu-Asn-Arg-Trp-Ile-Thr-Phe-Cys-Gln-Ser-
 Ile-Ile-Ser-Thr-Leu-Thr,

worin X für Ala-Pro, Pro, Met-Ala-Pro oder Met-Pro steht,

45

b) einem Polypeptid, welches ein allelisches Derivat des Polypeptids (a) ist,

c) einem Fusionspolypeptid, welches ein Polypeptid gemäß (a) enthält, in welchem die zusätzlich verknüpften Aminosäuren die biologische Aktivität nicht stören oder leicht entfernt werden können.

Außerdem betrifft die vorliegende Erfindung eine durch Rekombination hergestellte DNA, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 in einer Vektor-DNA, die zur Replikation in einer Prokaryoten- oder Eukaryoten-Zelle befähigt ist, in der die kodierende DNA-Sequenz in einer Position stromabwärts von einer Promotor-Sequenz angeordnet ist.

50

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner eine eukaryoten- oder Prokaryoten-Zelllinie, die mit dieser rekombinanten DNA transformiert ist, sowie ein Verfahren zur Herstellung von Human-Interleukin-2, bei dem in einem Kulturmedium eine Eukaryoten- oder Prokaryoten-Zelle, die mit einer rekombinanten DNA transformiert ist, kultiviert wird, um Interleukin-2 zu produzieren, und das gebildete Interleukin-2 gewonnen wird, wobei die rekombinante DNA eine DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 in einer Vektor-DNA enthält, die zur Replikation in dieser Zelle befähigt ist, wobei die kodierende Sequenz dieser DNA-Sequenz in einer Position stromabwärts von einer Promotorsequenz angeordnet ist.

55

Nachstehend werden spezielle Ausführungsformen der Erfindung und die erfindungsgemäß erzielten Vorteile anhand der Zeichnungen näher erläutert. Es zeigen:

60

Fig. 1 eine Restriktionsendonuclease-Spaltungskarte eines geklonten Gens, das zur Bildung eines Polypeptids mit der Aktivität von IL-2 (nachstehend kurz als "IL-2-Polypeptid" bezeichnet) kodiert ist;

Fig. 2 (a) die Basensequenz des geklonten Gens;

Fig. 2 (b) die Aminosäuresequenz I und die Aminosäuresequenzen II und III der Polypeptide mit IL-2-Aktivität;

Fig. 3 ein Fließschema, das den Aufbau einer rekombinanten DNA (pCEIL-2) in die das kodierte Gen eingesetzt ist, zeigt;

Fig. 4 den Plasmidvektor pTrS-3;

Fig. 5 (a), 5 (b) und 5 (c) Fließschemata, die den Aufbau rekombinanter DNAs (pTIL2-22, pTIL2-21, pTIL2-14 und pTIL2-15) unter Verwendung von pTrS-3 als Vektor erläutern;

Fig. 6 ein Fließschema, das den Aufbau einer rekombinanten DNA (pKIL2-21) unter Verwendung von pKT218 als Vektor erläutert;

Fig. 7 ein Fließschema, das den Aufbau einer rekombinanten DNA (pTuIL2-22) unter Verwendung von pTUBIP-5 als Vektor erläutert; und

Fig. 8 Vektor-DNAs, die zur Replikation in Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* in der Lage sind.

In den Figuren bedeuten A, G, C und T Desoxyadenylsäure, Desoxyguanylsäure, Desoxycytidylsäure bzw. Thymidylsäure.

Das für ein IL-2-Polypeptid kodierende, klonierte Gen kann durch Transkription einer IL-2 entsprechenden Messenger-RNA (mRNA, "RNA" ist eine Abkürzung für Ribonucleinsäure) (nachstehend als "IL-2-mRNA" abgekürzt), die aus Säugetierzellen mit der Fähigkeit zur Bildung eines Polypeptids mit IL-2-Aktivität stammt, zu einer komplementären DNA (cDNA) gebildet werden. Die erhaltene einzelsträngige cDNA (ss-cDNA) kann in eine doppelsträngige cDNA (ds-cDNA) übergeführt werden.

Die als Matrize für die Herstellung von cDNA verwendete mRNA kann auf herkömmliche Weise aus Säugetierzellen, die zur Bildung des IL-2-Polypeptids in der Lage sind, abgetrennt werden. Die abgetrennte RNA wird der Polyadenylierung unterworfen (Gillis et al., Immunological Rev., Bd. 63 (1982), S. 167-209). Die polyadenylierte RNA kann beispielsweise durch Zentrifugation an einem Saccharosedichtegradienten als Sediment von 11 bis 12 S fraktioniert werden. Gelegentlich zeigt mRNA mit 13S IL-2-mRNA-Aktivität. In diesen Fällen wird angenommen, daß mRNA in einer aggregierten Form von 11 bis 12 S mRNA vorliegt.

Als zur Bildung von IL-2 fähige Säugetierzellen, die die erfindungsgemäße mRNA-Quelle darstellen, können T-Lymphozyten, wie periphere, mononukleare Blutzellen, Mandelzellen, Milzzellen oder dergleichen, die aus Säugetieren erhältlich sind, verwendet werden. Die Zellen können auf herkömmliche Weise vorbehandelt werden, beispielsweise mit Nylon-Säulen, Antiserum-Komplement, Dichtegradientenfraktionierung, mehrfache Enzymbehandlung, z. B. mit einer Kombination aus Neuraminidase und Galactose-oxidase, Röntgenbestrahlung oder Trypsin, um den Zellen die IL-2-Produktivität zu verleihen oder die IL-2-Aktivität zu erhöhen. Auch geklonte T-Lymphozyten, die aus den genannten Säugetierzellen nach Züchtung in Gegenwart von T-Zellwachstumsfaktor erhalten worden sind, können als mRNA-Zellen verwendet werden. Diese werden als T-Lymphozyten bevorzugt. Transformierte Lymphozyten-Zelllinien, wie von Leukämie- oder Lymphom-Zelllinien selbst oder von deren Derivaten, die durch die vorstehenden Vorbehandlungs- oder Mutationsverfahren erhalten worden sind, oder geklonte transformierte Zelllinien stellen bevorzugte mRNA-Quellen dar. Offensichtlich enthalten geklonte Zellen im allgemeinen größere Mengen IL-2-mRNA, als dies bei ursprünglichen Zelllinien der Fall ist. T-Zellhybride, die durch Fusion der vorerwähnten Lymphozytenderivatzellen und Tumorzelllinien, wie CEM, Molt 4 F und BW 5 147, erhalten worden sind, stellen ebenfalls erfindungsgemäß bevorzugte Säugetierzelllinien dar. In diesem Fall umfassen die von Lymphozyten abgeleiteten Zelllinien 1 konstitutive Bildner von IL-2 und 2 solche, die IL-2 nur in Gegenwart eines in die Kultur eingeführten Mitogens bilden, entweder in Abwesenheit oder in Gegenwart von anderen, die IL-2-Bildung mitstimulierenden Zellen.

Um IL-2-mRNA in konstitutiven IL-2-Bildnerzellen zu erzeugen, werden die konstitutiven IL-2-Bildnerzellen unter allgemein auf dem Gebiet der Zellkultur üblichen Bedingungen gezüchtet. Für die Erzeugung der mRNA in Zellen, die IL-2 nur in Gegenwart eines Mitogens bilden, werden die gezüchteten Zellen gründlich mit Kulturmedium gewaschen und in einem Kulturmedium, wie Rosewell Park Memorial Institute 1640 (anschließend als "RPMI 1640" bezeichnet), Dulbecco Modified Eagle Medium (kurz "DMEM") oder in Click-Medium, die gegebenenfalls Serum enthalten können, resuspendiert. Diese Kulturmedien können mit verschiedenen Zusätzen, wie Penicillin, Streptomycin oder anderen Antibiotika, oder mit frischem L-Glutamin, HEPES-Puffer und Natriumhydrogencarbonat in Konzentrationen, die auf dem Gebiet der Zellkulturtechnik üblich sind, ergänzt werden. Die bevorzugte Zelldichte beträgt 0,5 bis 4×10^6 Zellen/ml. Um die Aktivierung von mRNA und Bildung von IL-2 zu induzieren, werden geeignete Stimulantien zugesetzt. Beispiele für entsprechende Stimulantien sind Mitogene, Neuraminidase, Galactose-oxidase, Zinkderivate, wie Zinkchlorid, oder lymphozytenaktivierende Substanzen aus Mikroorganismen, wie Protein A und Streptolysin-O. Die stimulierten Zellen werden gewonnen und gewaschen. Die Mitogenanwesenheit von Macrophagen oder dendritischen Zellen während der Mitogenstimulation kann ebenfalls die mRNA aktivieren oder die Menge an aktivierter mRNA erhöhen. In ähnlicher Weise kann die Mitogenanwesenheit von Zelllinien, die von B-Lymphozyten oder von B-Lymphozytenlinien, wie Raji, Daudi, K562 und Ball-1, abgeleitet sind, die mRNA aktivieren oder die Menge an aktivierter mRNA erhöhen.

Um die Säugetierzellen zu vermehren, werden sie unter normalen Bedingungen in einer in vitro-Zellkultur oder in Tieren, die in bezug auf ihre Gewebsverträglichkeit passend sind, gehalten. Bei Anwendung der in vitro-

Kultur zur Herstellung der mRNA-Quelle werden die Zellen in beliebigen Züchtungsmedien, von denen vorher festgestellt wurde, daß sie das Wachstum von T-Zellen ermöglichen, gezüchtet. Diese Züchtungsmedien können gegebenenfalls mit Säugetierserum, Serumbestandteilen oder Serumalbumin ergänzt werden. Die Züchtungsdauer zur Aktivierung der mRNA entspricht der Dauer, die für die Aktivierung der Zellen zur Bildung von mRNA erforderlich ist. Dieser Zeitraum entspricht im allgemeinen der Dauer, die erforderlich ist, bis die Ausscheidung an IL-2 in das Züchtungsmedium beginnt. Ein bevorzugter Zeitraum beträgt 3 bis 12 Stunden nach Zugabe eines Stimulans, wie eines Mitogens. Eine unnötige Verlängerung der Züchtungsdauer kann gelegentlich zu einer Zersetzung der gebildeten IL-2 mRNA führen. Während des Verlaufs der Aktivierung von IL-2 bildenden Zellen, können Phorbolester, wie PMA oder TPA vorzugsweise in einer Konzentration von 10 bis 50 ng/ml, verwendet werden, um den Aktivierungsgrad zu fördern.

Das vorerwähnte Verfahren zur Aktivierung von IL-2-mRNA kann bei Temperaturen im Bereich von 32 bis 38 °C in einer angefeuchteten Atmosphäre und bei einem pH-Wert von etwa 7,0 bis 7,4 durchgeführt werden.

Nachstehend werden die Verfahren zur Gewinnung und Züchtung von Säugetierzellen, die zur Bildung von IL-2 in der Lage sind, näher erläutert.

(1) Bereitstellung einer Zelllinie mit konstitutiver IL-2-Bildung

Eine Jurkat-Zelllinie einer humanen, leukämischen T-Zelle (frei erhältlich beim Fred Hutchinson Cancer Institute, Seattle, V. St. A., Salk Institute, San Diego, V. St. A., Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) wird in Click-Medium in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml suspendiert und mit 8×10^3 Röntgenstrahlen mit einer Bestrahlungsmenge von 150 R/min bestrahlt. Anschließend werden von den auf diese Weise bestrahlten Zellen 0,1 Zellen pro 200 µl Medium in Click-Medium mit einem Gehalt an 5 Prozent FCS (fötales Kälberserum) in flachbodige Mikroplatten mit 96 Vertiefungen (Falcon 3072) überimpft und 3 Wochen bei 37 °C in einem Inkubator mit 5 Prozent CO₂ gezüchtet (Klonierung mit beschränkter Verdünnung). Die gezüchteten lebenden Zellen werden vor der Bildung von konfluenten Zellschichten in Züchtungsplatten (Nunc) mit 24 Vertiefungen übertragen und weitere 5 Tage gezüchtet. Diese Zellen werden sodann etwa 2 Tage bei einer ursprünglichen Zelldichte von etwa 1 bis 2×10^6 /ml in einem synthetischen Züchtungsmedium, das frei von Serum und Serumalbumin ist, gezüchtet. Der Kulturüberstand wird durch Zentrifugation geerntet und durch 0,22 Millipore-Filterpapier filtriert, um Zellbruchstücke abzutrennen und den Überstand zu sterilisieren. Anschließend werden durch Röntgenbestrahlung erzeugte Mutanten, die zur konstitutiven Bildung von IL-2 in der Lage sind, ausgewählt und geklont, wobei man die im Überstand vorhandene IL-2-Aktivität mißt.

(2) Bereitstellung von IL-2-Bildnerzellen aus humanen, peripheren, monoklearen Blutzellen

Peripheres Humanblut wird gewonnen. Daraus werden periphere Blutlymphozyten (kurz "PBL") durch Dichtegradientenzentrifugation an einer Ficoll-Hypaque-Vorrichtung isoliert. Die PBL werden in 2 ml Click-Medium mit einem Gehalt an 5 Prozent FCS mit einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in eine Nunc-Züchtungsplatte mit 24 Vertiefungen zusammen mit 100 µl einer 5 µg/ml-Lösung von Phytohämagglutinin-M (Gibco) (pHA) überimpft und 48 Stunden unter den vorstehend angegebenen Bedingungen gezüchtet. Sodann werden die Zellen gewaschen und wieder auf 1 ml Click-Medium in einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml zusammen mit 1 ml eines konditionierten Mediums, das aus Humansplenozyten hergestellt worden ist, unter Stimulation mit 2,5 µg/ml Concanavalin (kurz "Con A") 48 Stunden überimpft. Das Kulturmedium mit einem Gehalt an 50 Prozent des konditionierten Mediums wird jeden dritten Tag ausgetauscht, um eine Langzeitkultur von humanen T-Lymphozyten aus PBL zu erhalten. Die auf diese Weise hergestellten Langzeitkulturen von humanen T-Lymphozyten werden, wie vorstehend erläutert, durch das begrenzte Verdünnungsverfahren in Gegenwart von aus konditioniertem Medium abgeleiteten humanen Splenozyten geklont. Die Zellklone werden in entsprechender Weise vermehrt. Anschließend werden geklonte humane T-Lymphozyten auf 1 ml RPMI 1640 in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in Nunc-Kulturplatten mit 24 Vertiefungen in Gegenwart von 10 µg/ml PHA überimpft und 24 Stunden bei 37 °C in einem Inkubator in Gegenwart von 7,5 Prozent CO₂ gezüchtet. Die Überstände der Kulturflüssigkeit werden geerntet, zentrifugiert, durch ein 0,22 µm Millipore-Filter filtriert und auf ihre IL-2-Aktivität getestet, um die humanen, normalen T-Lymphozytenklone mit IL-2-Bildung zu identifizieren.

(3) Bereitstellung von malignen Zelllinien, die sich von Humanlymphozyten ableiten, die in Gegenwart eines Mitogens zur Bildung von IL-2 in der Lage sind

Jurkat-Zelllinien oder geklonte Zelllinien, wie Jurkat 111, die durch das vorstehend beschriebene begrenzte Verdünnungsverfahren erhalten worden sind, sind in der Lage, 10 bis 4000 Einheiten/ml IL-2 zu bilden, wenn sie 24 Stunden in einem vorerwähnten serumfreien, synthetischen Medium oder in RPMI 1640 mit einem Gehalt an 1 bis 2 Prozent Säugetierserum in Gegenwart eines Mitogens, wie 10 µg/ml Con A oder 2,5 µg/ml PHA gezüchtet werden. Diese malignen humanen Zelllinien bilden auch in Gegenwart von Zinkchlorid, Protein A oder Picibanil IL-2.

(4) Bereitstellung von Zellen, die zur IL-2-Bildung in Mitanzwesenheit eines Mitogens und anderen kostimulierenden Zellen oder kostimulierenden löslichen Faktoren in der Lage sind

Die humane, maligne Zelllinie Molt F4 und einige geklonte Zelllinien, wie Jurkat J99, die nach dem begrenzten Verdünnungsverfahren erhalten worden sind, bilden kein IL-2, selbst wenn sie 24 bis 72 Stunden in Gegenwart von Lectinen oder Mitogenen in beliebigen Konzentrationen gezüchtet werden. Jedoch werden diese Zellen zur Bildung von IL-2 in erheblichen Mengen (10 bis 100 µg/ml) bei einer Züchtungsdauer von 24 Stunden bei 37 °C fähig, wenn sie zusammen mit 5 bis 10 µg/ml Interleukin-1, einem der Monokine oder mit einer 50-prozentigen Anzahl an K562- oder Raji-Zellen gezüchtet werden.

Die Extraktion von IL-2-mRNA aus auf die vorstehende Weise aktivierten Zellen wird unabhängig von den unterschiedlichen Zellquellen nach herkömmlichen Verfahren durchgeführt. Beispielsweise werden Zellen teilweise oder vollständig durch Zusatz eines Detergens, wie Natriumdodecylsulfat und Desoxycholsäure, oder durch mechanische Homogenisierung oder Gefrieren/Auftauen aufgebrochen. Um einen Abbau von RNA durch Ribonuclease während der mRNA-Extraktion zu verhindern, werden vorzugsweise RNase-Inhibitoren, wie Heparin, Polyvinylsulfat, Bentonit, Macaroid, Diäthylpyrocarbonat oder Vanadyl-Komplex, zugesetzt. IL-2-mRNA kann aus präzipitiertem Polysom bei der IL-2-Biosynthese erhalten werden, das mit anti-IL-2-Antikörper durch Extraktion mit einem Detergens präzipitiert wird.

Die poly-A-enthaltende mRNA kann auf herkömmliche Weise fraktioniert oder konzentriert werden, beispielsweise durch Affinitätschromatographie oder durch absatzweise Absorption an oligo dT-Cellulose, poly U-Sephrose von Sepharose 2B, Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation oder Agarosegelelektrophorese.

Die mRNA-Fraktionen werden sodann auf ihre IL-2-mRNA-Aktivität getestet, indem man die biologischen Aktivitäten von durch Translation aus den mRNA-Fraktionen erhaltenen Proteinen testet oder das durch Translation erhaltene Protein unter Verwendung von monoklonalem Antikörper gegen das IL-2-Peptid identifiziert. Beispielsweise wird mRNA im allgemeinen durch Mikroinjektionen in Froscheier (*Xenopus laevis*) (J. B. Gurdon et al., Nature, Bd. 233 (1972), S. 177-182) oder unter Verwendung des mRNA-abhängigen Retikulolysats oder von zellfreien Weizenkeimtranslationssystemen translatiert.

Die IL-2-Aktivität kann durch das von Gillis et al., (J. Immunol., Bd. 120 (1978), S. 2027-2033) grundlegend erörterte Mikrobestimmungsverfahren ermittelt werden. Bei diesen Tests wird die IL-2-abhängige zelluläre Proliferation von zytotoxischen T-Lymphozytenzelllinien (kurz "CTLL"), die gemäß den Verfahren von Gillis et al. erzeugt worden sind, festgestellt. Dabei werden 4×10^3 CTLL-Zellen auf 100 µl RPMI 1640-Medium mit einem Gehalt an 2 Prozent FCS in flachbodige Mikroplatten mit 96 Vertiefungen zusammen mit 100 µl serienmäßig verdünnten Translationsprodukten überimpft. Nach 20-stündiger Inkubation bei 37 °C in einem Inkubator mit 5 Prozent CO₂, werden die Zellen 4 Stunden mit 0,5 µCi ³H-TdR gepulst und mit Hilfe eines automatischen Zellerntegeäts an Glasfaserstreifen geerntet. Anschließend wird die eingebaute Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung gemessen. Gemäß diesem Testverfahren wird festgestellt, daß die in Gegenwart von IL-2 gezüchteten CTLL-Zellen ³H-TdR in einer dosisabhängigen Weise einbauen, was eine Berechnung der Menge an in den Testproben eingebautem IL-2 ermöglicht.

IL-2 ist in der Lage, die Proliferation von T-Lymphozyten zu fördern, was die Messung der IL-2-Aktivität unter Verwendung eines Index der C-Zellwachstumsaktivität ermöglicht. Dabei werden 5 CTLL-Zellen auf 100 µl DMEM mit einem Gehalt an 2 Prozent FCS in flachbodige Mikroplatten mit 96 Vertiefungen zusammen mit 100 µl der serienmäßig verdünnten Translationsprodukte übertragen. Nach 72- bis 96-stündiger Inkubation bei 37 °C in einem Inkubator bei 5 Prozent CO₂ wird die Anzahl der gezüchteten und aktivierten Zellen unter dem Mikroskop gezählt. Als positive externe Kontrolle werden 100 Einheiten/ml bzw. 10 Einheiten/ml an IL-2 zugesetzt. Die IL-2-Aktivität der Testprobe wird im Vergleich mit der Anzahl der in diesen Kontrollgruppen gezüchteten lebensfähigen Zellen berechnet.

Die auf diese Weise erhaltene IL-2-mRNA aus der aktivsten Fraktion wird als Schablone zur Synthese von ds-cDNA verwendet. Die ds-cDNA wird mit einer Vektor-DNA verknüpft. Die Synthese von cDNA wird nach üblichen Verfahren durchgeführt.

Zunächst wird ss-cDNA, die zu mRNA komplementär ist, in Gegenwart von dATP, dGTP, dCTP, dTTP unter Einsatz von reverser Transkriptase und unter Verwendung von mRNA als Matrize (template) und oligo-dT als Initiator (primer) hergestellt. Die Matrizen-mRNA wird sodann durch alkalische Behandlung entfernt. Man erhält ds-cDNA unter Verwendung von reverser Transkriptase oder DNA-Polymerase und unter Einsatz der vorstehend synthetisierten ss-cDNA als Matrize.

Durch rekombinante Technik gebildete DNA wird aus der auf diese Weise erhaltenen ds-cDNA und einer Vektor-DNA mit einem Replikon, das zur Replikation in eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen in der Lage ist, erhalten. Die rekombinante DNA wird anschließend in die Wirtszellen eingebaut.

Die ds-cDNA und eine zur Vermehrung in eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen fähige Vektor-DNA werden vor der Ligation durch verschiedene Verfahren, wie Behandlung mit Exonuclease, Zugabe von chemisch synthetisierten DNA-Stücken und G, C-Schwanzung unter Bildung von mit den Enden der ds-cDNA und der Vektor-DNA verknüpfbaren Termini, modifiziert. Die Verknüpfung der verknüpfbaren DNA wird beispielsweise durch T₄-Phagen-DNA-Ligase in Gegenwart von ATP durchgeführt.

Mit der auf diese Weise erhaltenen rekombinanten DNA werden lebende Zellen zur Verstärkung der klonierten cDNA oder zur Bildung von IL-2-Polypeptid transformiert.

Beispiele für eukaryontische Wirtsorganismen, die zur Bildung von IL-2 verwendet werden können, sind Wirbeltiere, Hefen und dergleichen. Beispielsweise können Affenzellen, wie CV-1-Zellen, die durch eine ursprüngliche defektive Mutante von SV-40 transformiert sind und das SV-40-große T-Antigen exprimieren (COS-Zellen gemäß Y. Gluzman (Cell, Bd. 23, (1981), S. 175-182), von Mäusen abgeleitete Zellen gemäß S. Ohno und T. Taniguchi (Nucleic Acids Research, Bd. 10 (1982), S. 967-977) und zur Expression von IFN-Gen angewandte Hefewirtsvektorsysteme gemäß R. Hitzeman et al. (Nature, Bd. 293 (1981), S. 717-722), verwendet werden. Geeignete prokaryontische Wirtsorganismen sind Escherichia coli und dergleichen. Zur Amplifikation von DNA in Wirtsorganismen wird E. coli als Wirt bevorzugt, jedoch können auch andere Wirte eingesetzt werden.

Geeignete Vektoren für E. coli sind Plasmidvektoren vom EK-Typ (stringenter Typ), wie pSC101, pRK353, pRK646, pRK248, pDF41 und dergleichen, Plasmidvektoren von EK-Typ ("relaxed"-Typ), wie ColE1, pVH51, pAC105, RSF2124, pCR1, pMB9, pBR313, pBR322, pBR322, pBR324, pBR325, pBR327, pBR328, pKY2289, pKY2700, pKN80, pKC7, pKB158, pMK2004, pACYC1, pACYC184, λ du 1 und der λ du 1-geleichen, sowie Phagenvektoren von λ gt-Typ: λ gt. λ c, λ gt. λ B, λ WES, λ C, λ WES. λ B, λ ZJvir., λ B', λ ALO, λ B, λ WES. Ts622, λ Dam und dergleichen. Im allgemeinen wird pBR322 häufig als Vektor für E. coli verwendet. In diesem Fall sind die besten klonierenden Stellen die PstI- und EcoRI-Stellen.

Die Transformation der Wirtszelle mit der rekombinanten DNA kann auf übliche Weise folgendermaßen durchgeführt werden:

Handelt es sich beim Wirt um einen Prokaryonten, wie E. coli, werden entsprechende Zellen, die zur DNA-Aufnahme geeignet sind, aus Zellen hergestellt, die nach bekannten Verfahren nach der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und anschließend gemäß dem CaCl_2 -Verfahren behandelt worden sind. Wenn MgCl_2 oder RbCl im Reaktionsmedium der Transformation vorhanden ist, erhöht sich die Transformationswirksamkeit. Die Transformation kann auch nach Bildung eines Protoplasten der Wirtszelle durchgeführt werden.

Handelt es sich beim Wirt um einen Eukaryonten, kann ein Transfektionsverfahren von DNA, wie Calciumphosphat-Niederschlagsbildung, herkömmliche mechanische Verfahren, z. B. Mikroinjektion, Insertion eines in rote Blutzellwirte oder in Liposomen eingekapselten Plasmids, Behandlung von Zellen mit Mitteln wie Lysophosphatidylcholin oder Verwendung von Virusvektoren oder dergleichen, angewandt werden.

Zellen mit dem IL-2-Gen können nach der Transformation nach einem der folgenden beiden Verfahren isoliert werden.

(1) Beim Plus-Minus-Verfahren wird partiell gereinigte IL-2-mRNA durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation von mRNAs, die aus mit einem Mitogen aktivierten Säugetierzellen als 11- oder 12s-Sediment extrahiert worden sind, erhalten, und anschließend wird ^{32}P -radioaktiv markierte ss-cDNA unter Verwendung von teilweise gereinigter mRNA als Matrize synthetisiert. Nach Entfernung der Matrizen-mRNA durch alkalische Behandlung, wird die isolierte cDNA mit partiell gereinigter 11- oder 12s-mRNA, die aus nicht mit einem Mitogen aktivierten Säugetierzellen extrahiert worden ist, hybridisiert. Anschließend werden nicht hybridisierte und hybridbildende cDNA an einer Hydroxylapatitsäule chromatographisch fraktioniert. Die nicht-hybridisierte cDNA und die hybridisierte cDNA werden vorläufig als "Sonde" A bzw. "Sonde" B bezeichnet. Transformanten werden auf 2 Nitrocellulosefiltern praktisch in gleicher Weise gezüchtet. Die DNA der Zellen wird durch Alkalibehandlung auf dem Filterpapier fixiert. Sonde A und Sonde B werden mit der DNA an 2 verschiedenen Filterpapieren hybridisiert. Anschließend wird eine autoradiographische Bestimmung durchgeführt, um die Transformanten auszuwählen, die mit der Sonde A positiv reagieren (+), aber mit der Sonde B schwach oder gar nicht reagieren (-) (Taniguchi et al., Proc. Jpn. Acad., Bd. 155B (1979), S. 464-469).

(2) Das zweite Verfahren besteht darin, beispielsweise 1000 bis 10 000 Transformantenklone in Gruppen von jeweils einige 10 bis einige 100 Klone aufzuteilen. Die aufgeteilten Klongruppen werden jeweils auf herkömmliche Weise zur Bildung von Plasmid-DNAs gezüchtet. Anschließend werden diese Plasmid-DNAs in ss-cDNAs umgewandelt, beispielsweise durch Wärmedenaturierung. Die erhaltenen ss-cDNAs werden auf Nitrocellulosefilterpapier fixiert, um die Hybridisierung von mRNA, die komplementär zu den fixierten DNAs ist und aus Säugetierzellen hergestellt worden ist, unter Einschluß von aktivierter IL-2-mRNA zu erreichen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, mRNAs mit einem Gehalt an IL-2-mRNA mit wärmedenaturierten Plasmid-DNAs zu hybridisieren und anschließend das DNA-mRNA-Hybrid auf Nitrocellulosefilterpapiere zu fixieren. Diese Filterpapiere werden sodann mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration, wie 1 millimolar N-Z-Hydroxyethylpiperazin-n-2-ethansulfonsäure oder mit 10 millimolar NaCl , gewaschen. Die am Filterpapier adsorbierte mRNA wird durch Behandlung von beispielsweise 1 Minute bei 95 °C mit einer Lösung mit einem Gehalt an 0,5 millimolar EDTA und 0,1 Prozent SDS extrahiert. Gereinigte mRNA wird säulenchromatographisch unter Verwendung von oligo-dT-Cellulose gewonnen. Anschließend wird die Translation der mRNA in Protein durch Mikroinjektion in Eier von *Xenopus laevis* durchgeführt, um die IL-2-Aktivität festzustellen, oder die mRNA wird in ein Protein translatiert, wobei das mRNA-abhängige Retikulozytensystem oder das in vitro-zellfrei Weizenkeimtranslationssystem verwendet wird, um die IL-2-Aktivität unter Verwendung von anti-IL-2-Antikörper zu analysieren. Gemäß diesen Verfahren wird die Gruppe,

in der die Anwesenheit von IL-2-Aktivität festgestellt wird, wiederholt in weitere Gruppen mit einer geringeren Anzahl an Transformantenklonen unterteilt, bis ein einziger Klon mit IL-2-DNA spezifiziert ist.

Um für IL-2-Polypeptid kodierende cDNA aus der IL-2-bildenden Transformante zu erhalten, wird die rekombinante DNA in der Transformante abgetrennt und mit einer Restriktionsendonuclease gespalten. Aus den durch die Spaltung gebildeten DNA-Fragmenten wird die Insert-cDNA-Fraktion abgetrennt.

Die vollständige Nucleotidsequenz des PstI-DNA-Inserts, das für das IL-2-Polypeptid kodiert, aus der rekombinanten DNA von pIL2-50A wurde nach dem Verfahren von Maxam und Gilbert (Meth. Enzym., Bd. 65 (1980), S. 499-560) und nach dem Didesoxynucleotid-Kettenbeendigungsverfahren (A. J. M. Smith, Meth. Enzym., Bd. 65 (1980), S. 560-580) bestimmt.

Die Restriktionsendonuclease-Spaltungskarte des cDNA-Inserts und die Basensequenz des Inserts sind in Fig. 1 und Fig. 2 (a) angegeben, wobei die cDNA Spaltungsstellen mit Restriktionsendonuclease von BstNI, XbaI und BstNI in der angegebenen Reihenfolge aufweist.

Die DNA-Sequenz des Inserts enthält einen einzigen großen offenen Ableseraster. Die erste ATG-Sequenz, die üblicherweise bei Eukaryonten als Initiationssequenz dient (M. Kozak, Cell, Bd. 15 (1978), S. 1109-1123) wird bei den Nucleotiden 48 und 50 vom 5'-Ende an gefunden. Diesem ATG folgen 152 Codons, wonach sich bei den Nucleotiden 507 bis 509 das Terminationstriplet TGA anschließt.

Ein Bereich von A-Resten entsprechend dem 3'-poly (A)-Terminus der mRNA wird am Ende der cDNA gefunden. Voraus geht das Hexanucleotid AATAAA (Positionen 771 bis 776), das sich üblicherweise in den meisten eukaryontischen mRNAs findet (N. J. Proudfoot und C. G. Brownlee, Nature, Bd. 263 (1976), S. 211-214).

Die Aminosäuresequenz, für die die cDNA kodiert, konnte, wie in Fig. 2 (b) gezeigt, abgeleitet werden (Aminosäuresequenz I). Das Polypeptid der Aminosäuresequenz I besteht aus 153 Aminosäuren, dessen Molekulargewicht sich zu 17 631,7 Dalton berechnet. Entsprechend einem gemeinsamen Merkmal der meisten bisher bekannten Sekretionsproteine (G. Blobel et al., Symp. Soc. Exp. Med., Bd. 33 (1979), S. 9-36) ist der N-terminale Bereich des abgeleiteten IL-2-Polypeptids ebenfalls recht hydrophob. Dieser Bereich dient vermutlich als Signalpeptid, das während dem Sekretionsprozeß von reifem IL-2 abgespalten wird. Diese Spaltung erfolgt entweder zwischen Ser und Ala in den Stellungen 20 und 21 oder zwischen Ala und Pro in den Stellungen 21 und 22, wodurch das Polypeptid mit den Aminosäuresequenzen II und III entsteht. Ähnliche Spaltungsstellen finden sich häufig bei anderen Sekretionsproteinen (G. Blobel et al., Symp. Soc. Exp. Med., Bd. 33 (1979), S. 9-36). Das reife IL-2-Polypeptid enthält somit 133 oder 132 Aminosäuren, woraus sich ein berechnetes Molekulargewicht von 15 420,5 bzw. 15 349,4 Dalton ergibt. Dieser Wert wird mit dem bekannten Wert für Human-IL-2-Protein aus Jurkatzellen (15 000 Dalton) (S. Gillis et al., Immunological Rev., Bd. 63 (1982), S. 67-209) verglichen. Ferner wurde bestätigt, daß das DNA-Fragment ab dem CCT-Codon in den Stellungen 111 bis 113 in der Basensequenz, das somit für ein Polypeptid ab Pro in der Stellung 22 (Aminosäuresequenz III in Fig. 2 (b)) kodiert, ein Polypeptid mit IL-2-Aktivität exprimiert, wie in Beispiel 4 gezeigt ist. Es wurde auch bestätigt, daß das DNA-Fragment ab der GCA-Sequenz in den Stellungen 107 bis 110 in der Basensequenz, das somit für ein Polypeptid ab Ala in der Stellung 21 (Aminosäuresequenz II in Fig. 2 (b)) kodiert, ein Polypeptid mit IL-2-Aktivität exprimiert, wie in Beispiel 7 gezeigt ist.

Bekanntlich tritt bei Eukaryontengenen häufig Polymorphismus auf, z. B. bei Humaninterferongen (Taniguchi et al., Gene, Bd. 10 (1980), S. 11-15, Ohno und Taniguchi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 77 (1980), S. 5305-5309, Gray et al., Nature, Bd. 295 (1981), S. 501-508). In einigen Fällen ist der Polymorphismus von einem Ersatz bestimmter Aminosäuren der Proteinprodukte begleitet, während in anderen Fällen die Struktur des Proteinprodukts unverändert bleibt. Im Fall von Human-IL-2-cDNA, kann ein weiterer cDNA-Klon (pIL2-503), bei dem der A-Rest in der Stellung 503 von pIL2-50A-cDNA (Fig. 2) durch einen G-Rest ersetzt ist, nachgewiesen werden. Weitere cDNA-Klone mit einigen Basensubstitutionen im Vergleich zu pIL2-50A-cDNA lassen sich erwarten.

Aus den vorstehenden Ausführungen ergibt sich, daß die erfindungsgemäßen Gene folgendes einschließen: DNA mit der in Fig. 2 (a) gezeigten Basensequenz, DNAs ab der ATG-Sequenz in den Stellungen 48 bis 50 mit den sequentiellen Basen im Anschluß an die ATG-Sequenz bis mindestens zur ATC-Sequenz in den Stellungen 504 bis 506, DNAs ab der GCA-Sequenz in den Stellungen 108 bis 110 mit den sequentiellen Basen im Anschluß an die GCA-Sequenz bis mindestens zum ATC-Codon und DNAs ab der CCT-Sequenz in den Stellungen 111 bis 113 mit den sequentiellen Basen im Anschluß an die CCT-Sequenz bis mindestens zur ACT-Sequenz. Die erfindungsgemäßen Gene umfassen auch DNAs, die bei der ACT-Sequenz in den Stellungen 504 bis 506 enden und mit A in Stellung 1, der ATG-Sequenz in den Stellungen 48 bis 50, der GCA-Sequenz in den Stellungen 108 bis 110 oder der CCT-Sequenz in den Stellungen 111 bis 113 beginnen. Die erfindungsgemäßen Gene umfassen ferner DNAs, die bei der TGA-Sequenz in den Stellungen 507 bis 509 enden und mit A in der Stellung 1, der ATG-Sequenz in den Stellungen 48 bis 50, der GCA-Sequenz in den Stellungen 108 bis 110 oder der CCT-Sequenz in den Stellungen 111 bis 113 beginnen. Ferner umfassen die Gene der Erfindung DNAs, die bei C in Stellung 801 enden und mit A in Stellung 1, der ATG-Sequenz in den Stellungen 48 bis 50, der GCA-Sequenz in den Stellungen 108 bis 110 oder der CCT-Sequenz in den Stellungen 111 bis 113 beginnen. Weiterhin umfassen die erfindungsgemäßen Gene DNAs, die bei Poly (A) enden und mit dem ATG-Codon in den Stellungen 48 bis 50, der GCA-Sequenz in den Stellungen 108 bis 110 oder der CCT-Sequenz in den

Stellungen 111 bis 113 beginnen. Ferner umfassen die Gene der Erfindung Basensequenzen entsprechend des Aminosäuresequenzen I, II und III. Ferner können Polypeptide, denen eine oder mehrere Aminosäuren in der Aminosäuresequenz I fehlt, oder Polypeptide, bei denen eine oder mehrere der Aminosäuren der Aminosäuresequenz I durch eine oder mehrere andere Aminosäuren ersetzt sind, IL-2-Aktivität besitzen. Daher sind auch Gene, die für diese Polypeptide kodieren, geeignete Gene im Sinne der Erfindung. In ähnlicher Weise eignen sich erfindungsgemäß auch Gene mit einer additiven Verbindung von einer oder mehreren Basensequenzen, die zur Expression von einer oder mehrerer Aminosäuren zusätzlich zu den Aminosäuresequenzen I, II oder III in der Lage sind, sofern die zusätzlich verknüpften Aminosäuren die Wirkung der Polypeptide hinsichtlich ihrer IL-2-Aktivität nicht stören. Modifizierte, zusätzlich verknüpfte Aminosäurebereiche, die die Polypeptidfunktion im Hinblick auf IL-2 stören, können erfindungsgemäß ebenfalls verwendet werden, sofern die zusätzlich verknüpften Bereiche leicht beseitigbar sind. Entsprechendes gilt für die additive Verknüpfung von DNA an den 3'-Terminus von Genen entsprechend den Aminosäuresequenzen I, II und III, die für zusätzliche Aminosäuren am C-Terminus von I, II oder III mit den Aminosäuresequenzen I, II bzw. III kodieren. Daher kommt erfindungsgemäß die Verwendung von Genen, die für derartige Polypeptide kodiert sind, in Frage.

Rekombinante DNAs, die die Bildung von IL-2 in lebenden Zellen dirigieren, können nach verschiedenen Methoden konstruiert werden. Beispielsweise kann die kodierende Sequenz von IL-2-cDNA in ein Expressionsvehikel abwärts der Promotorsequenz eingesetzt werden. Eine andere Möglichkeit besteht darin, ein cDNA-Stück mit einer Promotorsequenz aufwärts zur IL-2-Kodierungssequenz nach oder vor der Insertion von cDNA in das Expressionsvehikel einzusetzen.

Verfahren zur Konstruktion von prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen, die IL-2-cDNA exprimieren und das IL-2-Polypeptid bilden, sind nachstehend näher erläutert.

(1) Expression von IL-2-cDNA in *E. coli*

Um IL-2-cDNA in *E. coli* zu exprimieren, wird cDNA mit verschiedenen bakteriellen Promotoren verschmolzen. Es werden Hybridplasmide, die cDNA abwärts von den Promotoren enthalten, erhalten. Die Plasmide werden der Transfektion, z. B. in den Stamm *E. coli* HB101 unterzogen und Bakterien, die ein Proteinprodukt mit humaner IL-2-Aktivität synthetisieren, werden kloniert. Im wesentlichen sollten beliebige Arten von bakteriellen Promotoren die Expression von IL-2-cDNA dirigieren, wenn sie in entsprechender Weise an der cDNA anliegen. Beispiele für diese cDNA-Expression sind hier beschrieben.

Die klonierte cDNA für IL-2 kodiert ein aus 153 Aminosäuren bestehendes Polypeptid, wie in Fig. 2 gezeigt. Der N-terminale Bereich entsprechend etwa 20 Aminosäuren dieses Polypeptids ist recht hydrophob, was eine charakteristische Eigenschaft der meisten Sekretionsproteine darstellt. Eine derartige hydrophobe Sequenz, die sogenannte Signalsequenz, wird während des Sekretionsprozesses abgespalten. Daher soll das reife IL-2-Polypeptid weniger als 153 Aminosäuren enthalten. Somit ist es erwünscht, den cDNA-Teil, der das reife IL-2-Polypeptid kodiert, jedoch nicht den Bereich, der der IL-2-Signalsequenz entspricht, zu exprimieren.

(i) Konstruktion eines Expressionsplasmidvehikels, pTrS-3, das *E. coli*-trp-Promotor, dessen Ribosomenbindungsstelle (SD-Sequenz) für das Leitpeptid kürzlich beschrieben wurde (G. Miozzari und C. Yanofsky, *J. Bacteriol.*, Bd. 133 (1978), S. 1457-1466) und ein ATG-Codon in einer Entfernung von 13bp abwärts zur SD-Sequenz umfasst (Nishi et al., *SEIKAGAKU*, Bd. 54, Nr. 8 (1982), S. 676). Das Plasmidvehikel enthält auch eine einzige SphI-Stelle unmittelbar abwärts von der ATG-Initiationssequenz (Fig. 4).

Zur Expression von IL-2-cDNA wird das Plasmid zunächst mit SphI gespalten und entweder mit *E. Coli*-DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) oder mit Bakteriophagen-T4-DNA-Polymerase I behandelt, um die 3'-vorstehenden Enden (Fig. 5 (a)) zu entfernen. Das Plasmid pIL2-50A wird 2-fach mit PstI und HgiAI gespalten, und ein größeres cDNA-Fragment wird isoliert. Die DNA wird sodann entweder mit *E. Coli*-DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) oder mit Bakteriophagen-T4-DNA-Polymerase behandelt, so daß die 3'-vorstehenden Enden geglättet werden. Die auf diese Weise behandelte cDNA kodiert IL-2-Polypeptid mit 132 Aminosäuren, wie in Fig. 5 (a) gezeigt. Diese cDNA wird sodann mit der auf die vorstehende Weise vorbehandelten pTrS-3-Plasmid-DNA so verknüpft, daß das ATG-Initiationscodon an der CCT (Pro)-Sequenz der IL-2-cDNA anliegt. Somit erhält man ein Plasmid pTIL2-22. Die Verbindung zwischen der trp-Promotorsequenz und der IL-2-cDNA-Sequenz von pTIL2-22 ist ebenfalls in Fig. 5 (a) dargestellt.

Das Plasmid pTIL2-22 sollte in *E. coli* die Synthese eines IL-2-Polypeptids mit 132 Aminosäuren ausgehend von Prolin dirigieren.

(ii) Da es auch möglich ist, daß das reife IL-2 Alanin (Stellung 21) als N-terminale Aminosäure anstelle von Prolin enthält, wird das folgende Plasmid, das die Synthese von IL-2-Polypeptid mit 133 Aminosäuren dirigiert, erörtert.

Das Plasmid pTrS-3 enthält eine einzige ClaI-Stelle zwischen der SD-Sequenz und der ATG-Sequenz (Fig. 4). Dieses Plasmid wird durch ClaI und SalI gespalten. Das Plasmid pIL2-50A wird partiell mit pstI gespalten, mit *E. coli*-DNA-Polymerase I behandelt, und die größte lineare DNA wird isoliert. Die DNA wird sodann mit einem synthetischen DNA-Linker mit einem Gehalt an einer Restriktions-XhoI-Spaltungsstelle verknüpft, und ein Klon mit einem Gehalt am Plasmid pIL2-50A (Xho), in dem die Linker-DNA in der 3'-Stellung abwärts von der IL-2-kodierenden Sequenz eingeführt ist, wird isoliert. Das Plasmid pIL2-50A (Xho) wird zunächst mit HgiAI gespalten, entweder mit *E. Coli*-Klenow-Fragment oder mit T4-DNA-Polymerase behandelt, mit XhoI gespalten,

und das cDNA-Fragment wird isoliert. Dieses cDNA-Fragment wird sodann mit pTrS-3-DNA, die mit ClaI und SalI und mit einer synthetischen DNA vorbehandelt ist, verknüpft, wie in Fig. 5 (b) gezeigt ist. Somit läßt sich ein Plasmid pTIL2-21, das in E. coli die Synthese eines IL-2-Polypeptids mit 133 Aminosäuren, ausgehend von Alanin, dirigieren sollte, herstellen, wie in Fig. 5 (b) erläutert ist. Eine ähnliche Konstruktion kann auch ohne Verwendung von XhoI-Linker durchgeführt werden.

(iii) IL-2-Polypeptide abweichender Größe mit abweichender N-terminaler Aminosäure können unter Verwendung des pTrS-3-Expressionsplasmidvehikels nach folgenden Verfahren hergestellt werden. Die geklonte IL-2-cDNA in pIL2-50A enthält eine einzige DdeI-Stelle in den Nucleotidstellungen 81 bis 85. Das Plasmid pIL2-50A (Xho) wird durch DdeI gespalten, und das DNA-Fragment mit einem Gehalt am größeren Teil der cDNA wird isoliert. Das Fragment sollte auch DNA mit etwa 3000 Basenpaaren von pBR322 enthalten (Fig. 5 (c)). Das DNA-Fragment wird mit Exonuclease Bal31 behandelt und anschließend mit XhoI gespalten. Die so behandelte DNA wird sodann mit pTrS-3, das mit SphI gespalten, entweder mit Klenow-Fragment oder mit T4-DNA-Polymerase behandelt und sodann mit SalI gespalten ist, verknüpft, wie in Fig. 5 (c) gezeigt ist. Die verknüpfte DNA wird sodann der Transfektion in E. coli HB101 unterworfen, und bakterielle Klone, die humanes IL-2 exprimieren, werden ausgesucht (Screening). Diese Klone sollten humanes IL-2 unterschiedlicher Größen exprimieren, da die DNA entsprechend dem N-terminalen Bereich von humaner IL-2 auf unterschiedliche Weise entfernt ist. Somit lassen sich pTIL2-14 und pTIL2-15, die IL-2-DNA tragen, erhalten.

(iv) Die IL-2-cDNA kann auch unter Verwendung von pKT218 (bereitgestellt von K. Talmage, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 77 (1980), S. 3369-3373) exprimiert werden. Plasmid-pKT218 wird mit pstI gespalten und mit einem IL-2-cDNA-Insert, das durch Spalten von pIL2-50A-DNA mit HgiAI und pstI erhalten worden ist, verknüpft (Fig. 6). Das erhaltene Plasmid pKIL2-21 weist die Sequenz zu Beginn der Proteinsyntheseinitiation auf, wie in Fig. 6 gezeigt. Somit sollte das Plasmid pKIL2-21 in E. coli die Synthese eines verschmolzenen Polypeptids mit 133 Aminosäuren von IL-2 und den Aminosäuren von β -Lactamase dirigieren (das erste Methionin ist in E. coli abgespalten).

(v) Ein Expressionsplasmid pTuBIP-5, bei dem die Promotorsequenz für tufB in pBT322 eingesetzt ist, wird zunächst konstruiert (Taniguchi et al., SEIKAGAKU, Bd. 53 (1981), S. 966). Das Plasmid enthält eine einzige ClaI-Stelle, die sich 2 Basenpaare abwärts von der SD-Sequenz befindet, wie in Fig. 7 gezeigt.

Da pTrS-3 auch eine ClaI-Stelle zwischen der SD-Sequenz und der ATG-Initiationssequenz enthält und da diese ClaI-Stelle während der Konstruktion des Expressionsplasmids unter Verwendung von pTrS-3 und IL-2-cDNA auf die vorstehend beschriebene Weise nicht zerstört wird, ist es sehr einfach, den bakteriellen Trp-Promotor mit dem von tufB zu ersetzen, so daß humane IL-2-cDNA unter der Kontrolle des tufB-Promotors exprimiert wird. Beispielsweise wird pTIL-2-22 mit ClaI und PvuII gespalten, und das DNA-Fragment mit einem Gehalt an IL-2-cDNA wird isoliert. Dieses Fragment wird sodann mit pTUBIP-5-DNA, die vorher mit ClaI und PvuII gespalten ist, verknüpft. Somit wird ein Plasmid pTuIL2-22 konstruiert, wie in Fig. 7 gezeigt ist. Die IL-2-Aktivität konnte im Extrakt von E. coli HB101 mit einem Gehalt am Plasmid pTuIL2-22 nachgewiesen werden.

(vi) Eine ähnliche Konstruktion kann auch unter Verwendung von pTIL2-21 und von im wesentlichen sämtlichen Expressionsplasmiden, die bei Verwendung von pTrS-3 konstruiert werden, durchgeführt werden. Es ist auch möglich, den Abstand zwischen der SD- und ATG-Sequenz durch Spalten, z. B. pTuIL2-22 mit ClaI, Entfernen (oder Zusetzen) einiger Basenpaare von DNA durch Bal31 oder SI oder DNA-Polymerase I (E. coli) und anschließendes Wiederverknüpfen des Plasmids zu optimieren.

(2) Expression der IL-2-cDNA in Hefe

IL-2-cDNA kann auch in Hefe exprimiert werden, indem man die cDNA in geeignete Expressionsvektoren einsetzt und das Produkt in Wirtszellen einführt. Es wurde über verschiedene shuttle-Vektoren zur Expression fremder Gene in Hefe berichtet (R. Heitzman et al., Nature, Bd. 293 (1981), S. 717-722, P. Valenzuela et al., Nature, Bd. 298 (1982), S. 347-350, Miyanoohara et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 80 (1983), S. 1-5). Die Vektoren sind zur Replikation in E. coli- und in Hefe-Wirten fähig und enthalten Promotorsequenzen von Hefegenen. Im wesentlichen können alle derartigen Expressionsvektoren zur Expression von IL-2-cDNA verwendet werden. Bei Verwendung von Hefe kann es im Vergleich zur Verwendung von tierischen Zellen oder Bakterien zu höheren IL-2-Konzentrationen kommen. Nachstehend wird ein Beispiel für die Expression von Human-IL-2-cDNA in Hefe beschrieben.

Die Hefe-E. coli-shuttle-Vektoren pAT77 und pAM82 wurden von Miyanoohara et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 80 (1983), S. 1-5) beschrieben. Beim Vektor pAM82 handelt es sich um ein Derivat von pAT77. Beide tragen Marker von ars 1 (D. T. Stinchcomb et al., Nature, Bd. 282 (1979), S. 39-43), 2 μ m ori (J. R. Broach et al., Gene, Bd. 8 (1979), S. 121-133) und leu2 (B. Ratzkin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 74 (1979), S. 474-491) und den Promotor für das Gen der sauren Phosphatase (APase) von Hefe. Sie tragen auch das 3,7 kb-DNA-Segment von pBR322, das einen Marker für Ampicillinresistenz (Ap^r) und den Replikationsursprung enthält (Fig. 8). Der APase-Promotor kann durch Verschiebung einer hohen Phosphatkonzentration zu einer niedrigen Konzentration in den Kulturmedien induziert werden. Um Human-IL-2-cDNA zu exprimieren, wird pIL2-50A nach Behandlung mit E. coli-Klenow-Fragment oder mit T4-DNA-Polymerase mit PstI gespalten, die cDNA wird mit pAM82, das vorher mit XhoI gespalten ist, verknüpft und

mit dem E. coli-Klenow-Fragment inkubiert, um die Enden aufzufüllen. Hybridplasmide, bei denen die für cDNA kodierende Sequenz abwärts der Hefe-APase-Promotorsequenz liegt, werden durch Klonierung in E. coli ausgewählt. Das erhaltene Plasmid, pYIL-2a wird in Hefe eingeführt. Nach Induktion des APase-Promotors wird die IL-2-Aktivität im Hefeextrakt gemessen. Das Plasmid pYIL-2A enthält einen Bereich der GC-Reste zwischen dem Hefepromotor und der IL-2-cDNA. Es ist möglich, daß eine derartige Sequenz die Expression von IL-2-cDNA hemmt. Um diese Schwierigkeit zu beseitigen, kann folgende Konstruktion eines Plasmids durchgeführt werden: Das Plasmid pIL2-50A wird mit PstI gespalten, und das cDNA-Insert wird isoliert. Diese cDNA wird sodann mit T4-DNA-Polymerase in Gegenwart von dATP, dGTP und dTTP behandelt, so daß die Bereiche der C-Reste an beiden Enden der cDNA abgetrennt und anschließend mit Nuclease S1 behandelt werden, um die Bereiche der G-Reste zu entfernen. Diese DNA wird mit XhoI-DNA-Linker und Plasmid pBR322, dessen EcoRI-Stelle gespalten und durch EcoRI und das Klenow-Fragment stumpf gemacht worden ist verknüpft. Das gebildete Plasmid pIL2-Xho wird mit XhoI gespalten, und das cDNA-Insert wird isoliert. Die cDNA wird sodann in die einzige XhoI-Stelle von pAM82 eingeführt, und ein Plasmid mit einem Gehalt an der für IL-2 kodierenden Sequenz, die in bezug auf den Hefe-APase-Promotor korrekt orientiert ist, wird in E. coli kloniert. Das Plasmid pYIL-2b wird in Hefe eingeführt. Nach Induktion des APase-Promotors wird die IL-2-Aktivität im Hefeextrakt gemessen.

(3) Expression der cDNA in Säugetierzellen

Ein Plasmid, das die Synthese von Human-IL-2 in Säugetierzellen steuern sollte, läßt sich folgendermaßen konstruieren: Ein Plasmid pCE-1 wird aus pKCR (K. O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 78 (1981), S. 1527-1531) und aus pBR328 (X. Soberon et al., Gene, Bd. 9 (1980), S. 287-305) gemäß einer Serie von Modifikationsverfahren gemäß Fig. 3 konstruiert. Die Initiationssequenz ATG des IL-2-Gens wird abwärts vom Promotor für das SV40-frühe Gen verknüpft. Das Plasmid enthält eine einzige PstI-Stelle unmittelbar abwärts vom SV40-frühen Promotor und aufwärts von dem Teil des Kaninchen- β -Globin-chromosomalen Gens, das ein Intron enthält. Das Plasmid enthält auch den Replikationsursprung von SV40 sowie die Polyadenylierungsstelle für das frühe Gen. Somit wird ein Plasmid pCEIL-2, in dem das IL-2-Strukturgen von frühem Promotor von SV40 in entsprechenden Wirtszellen transkribiert werden sollte, erhalten (Fig. 3).

Dieses Plasmid wird mit HhaI gespalten und sodann durch DNA-Transfektion in die transformierte Affenzelllinie COS-7 transformiert, die die Replikation von DNA mit SV40-Ursprungssequenzen erlaubt. Es erscheint für eine wirksame Expression von cDNA wichtig, die Spaltung des Plasmids mit HhaI vor der Transfektion durchzuführen, da Sequenzen, die eine Replikation der transfizierten DNA in COS-Zellen behindern könnten, durch diese Vorgehensweise vom für die cDNA-Expression wesentlichen Teil des Plasmids entfernt werden können. Nach Transfektion des Vektors auf Affenkulturzellen COS-7 (Y. Gluzman, Cell, Bd. 23 (1981), S. 175-182) wird nach 1- bis 3-tägiger Züchtung unter üblichen Züchtungsbedingungen im allgemeinen IL-2 sekretiert und im gezüchteten Zellmedium gebildet. Um amplifizierte DNA in andere eukaryontische Zellen einzusetzen, wird in entsprechender Weise ein für den Wirtsorganismus geeigneter Vektor, der mit dem cDNA-Insert verknüpft ist, aus prokaryontischen Zellen gespalten und isoliert. Die eukaryontischen Zellen können mit dem auf diese Weise synthetisierten Vektor transfiziert und gezüchtet werden.

Zellen mit der rekombinanten DNA werden zur Amplifikation der rekombinanten DNA oder zur Bildung von IL-2-Polypeptid gezüchtet. Die Züchtung wird mit herkömmlichen Mitteln durchgeführt. Beispielsweise kann transformierte Hefe in einem Medium mit einem Gehalt an Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen, anorganischen Salzen und gegebenenfalls organischen Nährstoffen, wie Vitaminen und Aminosäuren, bei Temperaturen im Bereich von 20 bis 37 °C und einem pH-Wert von 4 bis 7 unter aeroben Bedingungen gezüchtet werden. Transformierte prokaryontische Organismen, wie E. coli können ebenfalls unter herkömmlichen Bedingungen gezüchtet werden.

Das intrazellulär oder extrazellulär gebildete IL-2 wird nach bekannten Verfahren gewonnen, beispielsweise durch Präzipitation mit Ammoniumsulfat, Dialyse zur Entfernung von Salzen (unter Normaldruck oder unter vermindertem Druck), Gelfiltration, Chromatographie, präparative isoelektrische Flachbett-Fokussierung, Gelelektrophorese, Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC) (Ionenaustausch, Gelfiltration und Chromatographie in reverser Phase), und Affinitätschromatographie an einem mit einem Farbstoff verbundenen Träger, an mit monoklonalen Antikörper gegen IL-2 gekuppelter Sepharose 4B oder an Sepharose 4B mit darangebundenem Lectin und dergleichen. Verfahren zur Gewinnung und Reinigung von IL-2 sind in folgenden Literaturstellen beschrieben: Watson et al., J. Exp. Med., Bd. 150 (1979), S. 849-861, Gillis et al., J. Immunol., Bd. 124 (1980), S. 1954-1962, Mochizuku et al., J. Immunol. Methods, Bd. 39 (1980), S. 185-201 und K. Welte et al., J. Exp. Med., Bd. 156 (1982), S. 454-464.

Das auf diese Weise erhaltene Polypeptid zeigt das gleiche biochemische und biologische Verhalten wie durch Säugetierzellen unter Mitogenstimulation gebildetes IL-2 und besitzt IL-2-Aktivität. Das Molekulargewicht beträgt etwa 15 000 Dalton. Die IL-2-Aktivität wird mit monoklonalen anti-IL-2-Antikörpern in Gegenwart oder Abwesenheit von Immunoabsorbentien, wie Igsorb (Enzyme Center) vollständig neutralisiert oder präzipitiert. Bei der Immunoelktrophorese zeigt das IL-2-Polypeptid nur ein einziges Präzipitität gegen den entsprechenden anti-IL-2-Antikörper. Die IL-2-Aktivität bleibt nach Reduktion mit 2-Mercaptoäthanol stabil und ist gegen Behandlung mit DNase und RNase sowie gegen eine 30-minütige Wärmebehandlung bei 56 °C beständig. Die

Aktivität ist bei einem pH-Wert von 2 bis 9 stabil. Das gebildete IL-2 fördert das Wachstum von monoklonalen funktionellen T-Zellen (zytotoxische T-Lymphozyten), verstärkt die Thymozytenmitogenese, führt zur Bildung von antitumorspezifischen zytotoxischen T-Lymphozyten aus dem Gedächtnis heraus in Abwesenheit des Antigens und kann zur Erhöhung der natürlichen Killerzellenaktivität gegen YAC-1- und RL δ 1-Zellen verwendet werden.

Ausführungsbeispiele:

Beispiel 1

(1) Eine humane T-Leukämiezelllinie, Jurkat-Zellen (in Japan, der Bundesrepublik Deutschland und den Vereinigten Staaten frei zugänglich) wurde in RPMI 1640-Medium mit einem Gehalt an 10 Prozent (Vol./Vol.) FCS suspendiert und bei Raumtemperatur 50 Sekunden mit einer Roentgenapparatur Exs 150/300-4 (Toshiba/Japan) bis 10 000 Roentgen bestrahlt. Anschließend wurden die bestrahlten Zellen 5 Tage bei 37 °C in einem Inkubator bei 5 Prozent CO₂ mit einer ursprünglichen Zelldichte von 1×10^5 Zellen/ml im vorerwähnten Kulturmedium gezüchtet. Die mutierten Zellen (0,2 Zellen/Vertiefung) wurden in Vertiefungen von 10-teiligen, flachbodigen Mikroplatten mit 96 Vertiefungen gebracht und 21 Tage bei 37 °C im Inkubator bei 5 Prozent CO₂ gezüchtet.

Aus diesen Vertiefungen erhaltene Klone wurden wiederholt in frisches Züchtungsmedium übertragen, um die Klongrößen zu steigern. Die vermehrten Klone wurden 24 Stunden bei einer ursprünglichen Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in Gegenwart von 50 µg/ml ConA gezüchtet. Die IL-2-Aktivität wurde nach den vorstehend beschriebenen Verfahren gemessen. Dann wurde eine humane T-Zelllinie, bezeichnet als Jurkat-111 (kurz J-111) (ATVV CRL8129), die aus den Ausgangs-Jurkatzellen kloniert worden war, ausgewählt, deren Produktivität in bezug auf IL-2 im Vergleich zum Ausgangsstamm auf das 40-fache erhöht worden war. Die klonierte Zelllinie J-111 wuchs unter herkömmlichen Bedingungen. Die Wachstumsgeschwindigkeit war praktisch gleich wie bei üblichen Jurkat-Zellen.

(2) Zellen (1×10^5 /ml) von J-111 wurden in 1000 ml serumfreiem, synthetischem Züchtungsmedium RITC 55-9 (T. Sato et al., Exp. Cell. Res., Bd. 138 (1982), S. 127-134) in Rollzuchtungsflaschen (Falcon 3027) überimpft und 4 Tage bei 37 °C gezüchtet. Die vermehrten Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet. Die geernteten Zellen wurden wiederum in das vorerwähnte Medium überimpft, das mit 25 µg/ml ConA (Zellgehalt 4×10^6 Zellen/ml) versetzt worden war. In 4 Ansätzen von Rollkulturflaschen (Falcon) wurden jeweils 1000 ml des beimpften Züchtungsmediums gebracht. Die Züchtung wurde 6 Stunden unter Rotieren fortgesetzt.

(3) Jurkat-Zellen ($1,2 \times 10^6$), die auf diese Weise mit 25 µg/ml ConA stimuliert worden waren, wurden in 8000 ml mit Kochsalzlösung ausgeglichem Phosphatpuffer (PBS) 6 Stunden suspendiert. Die Zellen wurden 2 mal durch Zentrifugation gewaschen und in 800 ml RSB-Lösung (10 millimolar Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 10 millimolar NaCl, 1,5 millimolar MgCl₂) mit einem Gehalt ein Ribonucleosid-Vanadyl-Komplex (10 millimolar), einem Nuclease-Inhibitor, resuspendiert. Anschließend wurde an Detergens bis zu einem endgültigen Gehalt von 0,05 Prozent zugesetzt. Sodann wurde mäßig gemischt und die Zellkultur wurde durch 5-minütige Zentrifugation bei 3000 U/min und 4 °C entfernt. SDS (0,5 %) und EDTA (5 millimolar) wurden zum Überstand gegeben, und die zytoplasmatische RNA wurde durch Zusatz eines gleichen Volumens an Phenol extrahiert. Nach 3-maliger Extraktion mit Phenol wurde die RNA mit dem 2-fachen Volumen an Äthanol präzipitiert. Die Präzipitate wurden durch Zentrifugation gewonnen und in 10 millimolar Tris-HCl vom pH-Wert 7,5 in Lösung gebracht. Die Menge an erhaltener RNA betrug 196 mg.

Die Fraktionierung von mRNA wurde unter Anwendung von Affinitätschromatographie an oligo-(dT)-Cellulose (P. L. Biochemicals, Typ 7) durchgeführt. Als Adsorptionslösung wurde eine Lösung vom pH-Wert 7,5 mit einem Gehalt an 20 millimolar Tris-HCl, 0,5 m NaCl, 1 millimolar EDTA und 0,5 Prozent SDS verwendet. Die Elution wurde mit Wasser und 10 millimolar Tris-HCl (pH-Wert 7,5) abwechselnd nach dem Waschen der Säule mit dem Puffer (20 millimolar Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 0,5 m NaCl, 1 millimolar EDTA) durchgeführt. Es wurden 3,6 mg mRNA eluiert. Anschließend wurden 2,4 mg der erhaltenen mRNA durch Saccharosedichtegradientenzentrifugation (5 bis 2,5 Prozent Saccharosedichtegradient in einer Lösung vom pH-Wert 7,5 mit einem Gehalt an 50 millimolar Tris-HCl, 1 millimolar EDTA und 0,2 m NaCl) fraktioniert. Es wurde 24 Stunden bei 26 000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Die 11- bis 12S-Fraktion von mRNA wurde in die Fraktionen Nr. 12, 13 und 14 in Mengen von 59, 46 bzw. 60 µg fraktioniert.

(4) Die in Fraktion Nr. 13 erhaltene mRNA wurde durch Mikroinjektion in Oozyten von *Xenopus laevis* (50 ng mRNA/Ei) verbracht. Der Züchtungsüberstand diente zur Bestimmung der IL-2-Aktivität. Wie in Tabelle I gezeigt, wurde ein Anstieg des Einbaus an ³H-TdR und ein Anstieg der Anzahl an aktivierten T-Lymphozyten festgestellt, was klar bestätigt, daß die mRNA in dieser Fraktion humane IL-2-mRNA enthält.

Tabelle I

(a)

5

Probe	Verdünnung	Aufnahme an $^3\text{H-TdR}$ (cpm)	Menge an IL-2* (Einheiten/ml)
Kontrolle I (Testmedium)	-	533	0
Kontrolle II (Überstand von nicht behandelter Eikultur)	x 2	590	0
Translationsprodukt von Fraktion 13	x 32	572	
	x 8	14 683	32
	x 32	10 165	

20

(b)

25

	Verdünnung	Zellzahl an T-Lymphozyten (Anzahl pro Vertiefung)	Menge an IL-2* (Einheiten/ml)
Kontrolle I (Testmedium)	x 2	0	0
	x 16	0	
Kontrolle II (Überstand von nicht behandelter Eikultur)	x 2	0	0
	x 16	0	
Translationsprodukt von Fraktion 13	x 2	115	40
	x 16	55	

35

* Die Einheiten wurden berechnet, indem man die Menge an eingebautem $^3\text{H-TdR}$ gemäß der Probit-Analyse mit Standard-IL-2 (10 Einheiten/ml) verglich.

40

(5) Anschließend wurde cDNA in vitro aus der Fraktion Nr. 13 von 11- bis 12S-mRNA mit einem Gehalt an IL-2-mRNA synthetisiert. Rekombinante DNA wurde mit dem Plasmidvektor PBR322 konstruiert. Mit der rekombinanten DNA wurde Escherichia coli transformiert. Klone mit erworbener IL-2-cDNA wurden folgendermaßen selektiert:

45

(5-1) 50 millimolarer Tris-HCl-Puffer (pH-Wert 7,5, 30 millimolar NaCl, 6 millimolar MgCl_2 , 5 millimolar Dithiothreitol (kurz "DTT"), jeweils 0,5 millimolar dATP, dGTP, dCTP, dTTP (dCTP enthielt ^{32}P -radioaktiv markiertes Produkt), 0,7 μg oligo (dT) $_{10}$, 10 μg mRNA und 15 Einheiten AMV-reverse Transkriptidase (J. W. Beard) wurden vermischt und 90 Minuten bei 41 °C belassen.

50

Nach beendeter Reaktion wurde DNA nach Phenolbehandlung als Äthanolpräzipitität gewonnen. Die DNA wurde in einer Lösung vom pH-Wert 7,5 mit einem Gehalt an 20 millimolar Tris und 1 millimolar EDTA in Lösung gebracht.

55

2,5 μg ss-cDNA wurden synthetisiert. Zur Entfernung der in dieser Lösung vorhandenen mRNA wurde die Lösung durch Zusatz von NaOH auf eine NaOH-Konzentration von 0,33 gebracht und 15 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde die Lösung mit einem gleichen Volumen an 1 M Tris-HCl von pH-Wert 7,5 neutralisiert und über eine mit Sephadex G-50 gepackte Säule gegeben. Man erhielt 1,8 μg cDNA.

(5-2) 50 millimolarer Phosphatpuffer vom pH-Wert 7,5, 10 millimolar $MgCl_2$, 10 millimolar DTT, jeweils 0,75 millimolar dATP, dGTP, dCTP, (dCTP enthält 3H -radioaktiv markiertes Produkt), 1,8 μg ss-cDNA und 8 Einheiten Polymerase I (BRL, V. ST. A.) wurden vermischt und 15 Stunden bei 15 °C umgesetzt. Nach beendeter Umsetzung wurde DNA nach Behandlung mit Phenol und Chloroform als Äthanolpräzipitat gewonnen. Es wurden 1,10 μg ds-cDNA gebildet. Ein Gemisch aus 50 millimolar Natriumacetat (pH-Wert 4,5, 0,2 m NaCl, 1 millimolar $ZnCl_2$ und 1,10 μg ds-cDNA wurde 20 Minuten bei 37 °C inkubiert, mit 0,25 Einheiten Nuclease S_1 (Sankyo, Japan) versetzt und 15 Minuten inkubiert.

Nach beendeter Umsetzung wurde das 2 mal mit Phenol behandelte Reaktionsprodukt auf eine mit einem Gelfiltrationsmedium der Fa. "Pharmacia Fine Chemicals Inc." gepackte Säule aufgesetzt, wodurch man 0,55 μg ds-cDNA erhielt.

(5-3) Ein Gemisch aus 0,14 m Kaliumkakodylat, 30 millimolar Tris-Base, 0,1 millimolar DTT, 1 millimolar $COCl_2$, 0,64 millimolar 32P-dCTP (spezifische Aktivität $2,7 \times 10^6$ cpm/nMol), 0,55 μg ds-cDNA und 5 Einheiten terminale Transferase (BRL) wurden 7 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend nach Phenolbehandlung auf eine mit dem voranstehend genannten Gelfiltrationsmedium gepackte Säule aufgesetzt, wodurch man 0,50 μg DNA als Äthanolpräzipitat erhielt. Die gewonnene DNA war an beiden 3'-Enden mit etwa 50 dCmP-Resten verlängert.

10 μg pBR322-DNA wurden mit dem Restriktionsenzym PstI gespalten. An die 3'-Enden der gespaltenen DNA wurde nach dem gleichen Verfahren, das vorstehend beim Zusatz von dCMP an ds-cDNA angewandt wurde, angefügt, mit der Ausnahme, daß dGTP anstelle von dCTP verwendet wurde.

(5-4) Ein Gemisch aus 50 millimolar Tris-HCl (pH-Wert 7,5), 0,1 m NaCl, 5 millimolar EDTA, 0,05 μg pBR322 (verlängert mit dGMP-Resten) und 0,01 μg cDNA (verlängert mit dCMP) wurde zunächst 2 Minuten bei 65 °C, dann 120 Minuten bei 46 °C, 60 Minuten bei 37 °C und schließlich 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. *E. coli* λ 1776 (R. Curtiss III et al., "Molecular Cloning of Recombinant DNA", Hrsg. W. A. Scott & R. Werner, Academic Press (1977)) wurde in 50 ml L-Brühe mit einem Gehalt an 100 $\mu g/ml$ Diaminopimelinsäure, 50 $\mu g/ml$ Thymidin, 1 Prozent Tryptophan, 0,5 Prozent Hefeextrakt, 0,5 Prozent NaCl und 0,1 Prozent Glucose überimpft. Die Züchtung wurde unter Schütteln bei 37 °C durchgeführt, bis die Züchtungsflüssigkeit bei 562 nm eine Absorption von 0,3 aufwies. Nach beendeter Züchtung ließ man die Kulturflüssigkeit 30 Minuten bei 0 °C stehen. Sodann wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation gewonnen und 2 mal mit 25 ml einer Lösung mit einem Gehalt an 5 millimolar Tris-HCl (pH-Wert 7,6), 0,1 m NaCl, 5 millimolar $MgCl_2$ und 10 millimolar RbCl gewaschen.

Die auf diese Weise erhaltenen Zellen wurden in 20 ml einer Lösung mit einem Gehalt an 5 millimolar Tris-HCl (pH-Wert 7,6), 0,25 m KCl, 5 millimolar $MgCl_2$, 0,1 m $CaCl_2$ und 10 millimolar RbCl suspendiert und 25 Minuten bei 0 °C stehengelassen. Anschließend wurden die Zellen gewonnen und in 1 ml der gleichen Lösung resuspendiert. Die vorstehend beschriebene rekombinante DNA wurde in 0,2 ml der Zellsuspension gegeben, und die Suspension wurde 60 Minuten bei 0 °C stehengelassen. Anschließend wurden 0,7 ml der L-Brühe zur Kultur zugesetzt. Es wurde 30 Minuten bei 37 °C geschüttelt. 0,1 ml des erhaltenen Züchtungsmediums wurden gründlich auf die Oberfläche von 1,5 Prozent Agarosemedium, das aus L-Brühe mit einem Gehalt an 100 $\mu g/ml$ Diaminopimelinsäure, 50 $\mu g/ml$ Thymidin und 15 $\mu g/ml$ Tetracyclin bestand, verteilt und 2 Tage bei 37 °C inkubiert.

(5-5) 432 aufgetretene Kolonien wurden in 18 Gruppen von jeweils 24 verschiedenen Bakterienklonen aufgeteilt, auf 200 ml L-Brühe mit einem Gehalt an 100 $\mu g/ml$ Diaminopimelinsäure, 50 $\mu g/ml$ Thymidin und 10 $\mu g/ml$ Tetracyclin überimpft und 5 bis 7 Stunden unter Schütteln bei 37 °C gezüchtet. Sodann wurden 200 ml einer frischen L-Brühe mit einem Gehalt an Chloramphenicol in einer Endkonzentration von 170 $\mu g/ml$ zugesetzt, wonach die Züchtung über Nacht fortgesetzt wurde. Die auf diese Weise amplifizierte Plasmid-DNA wurde auf herkömmliche Weise gereinigt. Klone mit einem Gehalt an IL-2-cDNA wurden mittels eines mRNA-Hybridisierungs-Translationstests (nachstehend "H-T-Test") ausgewählt. Der H-T-Test wurde auf folgende Weise durchgeführt:

25 μg gereinigte DNA wurden mit dem Restriktionsenzym HindIII gespalten, 3 mal mit Phenol behandelt, mit Phenol-Chloroform und mit Chloroform behandelt, mit Äthanol präzipitiert, mit 80 Prozent Äthanol gewaschen und in 40 μl 80-prozentigem Formamid gelöst.

Das Reaktionsgemisch wurde zur Denaturierung 5 Minuten auf 90 °C erwärmt und sodann auf 1,3 ml mit 10 x SSC (1,5 m NaCl, 0,15 m Natriumcitrat) verdünnt. Die DNA wurde anschließend auf Nitrocellulosefiltern fixiert. Diese Filter wurden 3 Stunden bei 80 °C getrocknet und 18 Stunden bei 37 °C in einer Lösung mit einem Gehalt an 50 Prozent Formamid, 20 millimolar Pipes vom pH-Wert 6,5, 0,5 m NaCl, 5 millimolar EDTA, 0,2 Prozent SDS und 250 μg poly(A)-mRNA aus induzierten J-111-Zellen zur Hybridisierung der an den Filtern fixierten DNA mit IL-2-mRNA inkubiert. Anschließend wurden die Filter 3 mal bei 65 °C mit einer Lösung aus 10 millimolar Pipes vom pH-Wert 6,5, 0,15 m NaCl, 1 millimolar Pipes, 10 millimolar NaCl gewaschen und 1 Minute bei 95 °C mit einer Lösung mit einem Gehalt an 0,5 millimolar EDTA und 0,1 Prozent SDS behandelt, um die hybridisierte mRNA von den Filtern zu gewinnen. Die auf diese Weise extrahierte mRNA wurde an einer oligo dT-Cellulosesäule auf herkömmliche Weise gereinigt und zur Bestimmung der IL-2-

Aktivität der translatierten Proteine in *Xenopus*-Oozyten injiziert. Eine von 18 Gruppen, die jeweils aus 24 Klonen bestanden, ergab beim vorbeschriebenen Test auf Einbau von ^3H -TdR eine positive Reaktion mit 48 Einheiten/ml IL-2-Aktivität, während sich die übrigen klar negativ verhielten. Die 24 zur positiven Gruppe gehörenden Einzelkolonien wurden in 200 ml L-Brühe der vorstehend angegebenen Zusammensetzung überimpft und unter aeroben Bedingungen 5 bis 7 Stunden bei 37 °C gezüchtet. In entsprechender Weise wurde frische L-Brühe mit einem Gehalt an Chloramphenicol zugesetzt. Nach Amplifikation der Plasmid-DNA durch Züchtung über Nacht wurde die Plasmid-DNA nach üblichen Verfahren gereinigt. Nach Spaltung von etwa 5 µg der einzelnen Plasmid-DNAs mit HindIII wurden die Plasmid-DNAs auf die gleiche Weise an Nitrocellulosefilter gebunden. Die Filter wurden mit IL-2-mRNA hybridisiert. Die hybridisierte mRNA wurde gewonnen und in *Xenopus* Oozyten injiziert, um die IL-2-Aktivität der translatierten Proteine zu bestimmen.

Wie sich aus Tabelle II ergibt, ergab nur die Plasmid-DNA, die aus einer einzigen Kolonie mit der Bezeichnung p3-16 gereinigt worden war, eine positive IL-2-Aktivität. Dieser Klon wird somit als Klon mit einem Gehalt an IL-2-cDNA identifiziert (*E. coli* λ 1776/p3-16 AJ 11995 (FERM-BP-225)). Diese Plasmid-DNA p3-16 weist genau die DNA (IL-2-Gen), die zur Bildung des speziellen Hybrids mit IL-2-mRNA in der Lage ist, auf.

Tabelle II

(a)

Probe	Verdünnung	Aufnahme an ^3H -TdR (cpm)	Menge an IL-2 (Einheiten/ml)
Kontrolle I (Testmedium)	-	2010	0
Kontrolle II (Überstand von nicht behandelter Eikultur)	x 2	2120	
	x 32	2482	0
Translationsprodukt von mRNA	x 2	20453	58
	x 32	20961	

(b)

Probe	Verdünnung	Zellzahl an T-Lymphozyten (Zellen pro Vertiefung)	Menge an IL-2 (Einheiten/ml)
Kontrolle I (Testmedium)	-	0	0
Kontrolle II (Überstand von nicht behandelter Eikultur)	x 2	0	0
	x 32		
Translationsprodukt con mRNA*	x 2	88	32
	x 32	42	

* mRNA, hybridisiert mit cDNA aus Plasmid p3-16.

Das cDNA-Insert des Plasmids p3-16 wird durch das Restriktionsenzym XbaI an einer einzigen Stelle und durch BstNI an 2 Stellen (aufwärts und abwärts zur XbaI-Spaltungsstelle) gespalten. Jedoch enthält das Plasmid p3-16 ein cDNA-Insert mit einem Gehalt an etwa 650 Basenpaaren, das offensichtlich einem Teil von IL-2-mRNA der Größe 11 bis 12S entspricht.

Eine weitere cDNA-Bibliothek wurde gemäß dem Verfahren von Land et al., (Nucleic Acids Res., Bd. 9 (1981), S. 2551) unter Verwendung von IL-2-mRNA als Matrize hergestellt. Einzelsträngige cDNA (1,6 µg) wurde unter Verwendung von 4 µg IL-2-mRNA (verlängert mit dCMP-Resten) synthetisiert. ds-cDNA wurde unter Verwendung von oligo-(dG)₁₂₋₁₈ als Primer für DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) synthetisiert. Die cDNA (0,6 µg) mit mehr als 680 Basenpaaren als DNA-Größenmarker wurde durch Saccharosegradientenzentrifugation erhalten und nach dem Standard-G-C-Schwänzungsverfahren in die PstI-Stelle von pBR322 eingesetzt. Nach Transformation von E. coli χ 1776 durch die rekombinante DNA wurden etwa 2000 Kolonien gemäß dem in situ-Hybridisierungsverfahren von Grunstein-Hogness mit Nick-translatiertem p3-16-cDNA-Insert als Sonde aufgefunden. Die Kolonie mit einem Gehalt am Plasmid pIL-250A mit einem Gehalt an etwa 850 Basenpaaren und der transformierte Klon (E. coli χ 1776/pIL-2-50A 11996 (FERM-BP-226)) wurden identifiziert. Eine Restriktionsendonuclease-Spaltungskarte des cDNA-Inserts von pIL-2-50A ist in Fig. 1 dargestellt.

Zur Isolation eines für das IL-2-Peptid kodierenden Gens aus transformiertem E. coli χ 1776 pIL-2-50A wurde Plasmid-DNA nach Isolation des DNA-Bereichs aus den Zellen nach üblichen Verfahren mit dem Restriktionsenzym PstI gespalten. Bei dem auf diese Weise gebildeten kleineren Fragment aus 2 gebildeten DNA-Fragmenten handelte es sich um DNA, die das IL-2-Peptid kodierte. Die vollständige Nucleotidsequenz des PstI-Inserts von pIL-2-50A wurde gemäß dem Verfahren von Maxam und Gilbert (Enzym., Bd. 65 (1980), S. 499-560) bestimmt. Die vollständige Struktur ist in Fig. 2 wiedergegeben.

Beispiel 2

Das Plasmid pKCR (O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Bd. 78, Nr. 3 (1981), S 1527-1531) besteht aus (i) Segmenten von SV40-DNA (In Fig. 3 durch schraffierte Blöcke wiedergegeben) mit einem Gehalt an frühem Genpromotor und einem Replikationsursprung (0,725 bis 0,648 m. u.) und einer Polyadenylierungsstelle aus dem frühen Gen (0,169 bis 0,144 m. u.), (ii) einem Teil des Kaninchen- β -Globin-Gens (als offene Blöcke dargestellt) (BamHI-PvuII-Fragment) und (iii) einem Segment von pBR322 (EcoRI-BamHI-Fragment), enthaltend einen Replikationsursprung und das Ampicillinresistenzgen. Dieses Plasmid wurde mit BamHI gespalten. Nach Auffüllen beider Enden der gespaltenen DNA durch DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) wurde synthetische PstI-Linker-DNA zur Konstruktion von pKCR (PstI) eingeführt. Plasmid-pKCR (PstI) wurde mit SalI gespalten, zur Auffüllung der Enden mit Klenow-Fragment behandelt und sodann partiell mit EcoRI gespalten, um ein EcoRI-SalI-Fragment, das die gesamte von SV40 abgeleitete DNA und das Globingen enthält, zu erhalten. Dieses Fragment wurde sodann mit einem Stück von pBR328-DNA verknüpft, das das Tetracyclinresistenzgen und einen Replikationsursprung enthält, wie in Fig. 3 dargestellt. Das erhaltene Plasmid pCE-1 enthält eine einzige PstI-Stelle unmittelbar abwärts vom SV 40-frühen Promotor.

Das cDNA-Insert von pIL-2-50A wurde durch PstI-Spaltung herausgeschnitten und an PstI-gespaltenes pCE-1 geknüpft, um pCEIL-2 zu konstruieren, um die Expression des IL-2-Strukturgens unter Kontrolle des SV40-frühen Promotors erfolgt. Plasmid-pCE-1 wurde ursprünglich zur cDNA-Klonierung durch das G-C-Schwänzungsverfahren (A. C. A. Chang et al., Nature, Bd. 275 (1978), S. 617-624) in Bakterien und direkte Expression in Säugetierzellen konstruiert.

Das Plasmid wurde mit HhaI gespalten und sodann durch DNA-Transfektion (McCutchan et al., J. Natl. Cancer Inst., Bd. 41 (1968), S. 351-357, in die transformierte Affenzelllinie COS-7 eingeführt, die eine Replikation der DNA mit einem Gehalt an SV40-Ursprungssequenzen enthält (erhältlich von Y. Gluzman (Cell, Bd. 23 (1981), S. 175-182)). Es erscheint für eine wirksame Expression von cDNA wichtig, das Plasmid vor der Transfektion mit HhaI zu spalten, da Sequenzen, die eine Replikation der transfizierten DNA in COS-Zellen hindern könnten, von dem für die cDNA-Expression bei diesem Verfahren wesentlichen Teil des Plasmids entfernt werden können. COS-7-Zellen (6×10^4 /ml) wurden in 0,5 ml DMEM mit einem Gehalt an 5 Prozent FCS in Züchtungsplatten mit 24 Vertiefungen (Nunc) suspendiert und 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Sodann wurden die gezüchteten Zellen mit einem Gemisch aus 1 µg des vorstehend beschriebenen Vektors, 17,6 µl 1 millimolar Tris-HCl mit einem Gehalt an 0,1 millimolar EDTA, 2,4 µl 2 m CaCl₂ und 120 µl 2 x HBS mit einem Gehalt an 50 millimolar Pipes, 280 millimolar NaCl und 1,5 millimolar Na₂HPO₄·12H₂O (pH-Wert 7,10) versetzt. Die Zellen wurden weitere 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Züchtungsmedium abgesaugt. Nach Waschen mit 1 ml PBS wurden 0,5 ml PBS mit einem Gehalt an 20 Prozent Glycerin zugesetzt. Nach 3-minütigem Stehenlassen bei Raumtemperatur wurde das Medium wieder abgesaugt. Die Zellen wurden mit 1 ml PBS gewaschen und in 1 ml DMEM mit einem Gehalt an 5 Prozent FCS gezüchtet. Jeweils nach 24 Stunden wurden 500 µl Medium durch frisches Medium ausgetauscht. Die einzelnen, zu den entsprechenden Zeitpunkten gewonnenen Medien wurden bis zur Verwendung bei 4°C belassen. 2 bis 3 Tage nach der Transfektion wurde das gezüchtete Zellmedium auf seine Aktivität an Human-IL-2 getestet. Wie aus Tabelle III hervorgeht, enthielt der Kulturüberstand von mit pCEIL-2 transfizierten COS-7-Zellen die IL-2-Aktivität. In den Kulturmedien von mit pCE-1 transfizierten Zellen konnte keine IL-2-Aktivität nachgewiesen werden.

Tabelle III

Transfektion der DNA mit	IL-2-Aktivität, gemessen durch ^3H -TdR-Aufnahme (μml)	Wachstum der T- Lymphozyten
pCEIL-2	12	++++
pCE-1	1	-

Die IL-2-Aktivität im Zellkulturmedium nach Transfektion von COS-7 mit pCEIL-2 wurde mit Mäuse-(BALB/c)-antihuman-IL-2-monoklonalem Antikörper von 12 Einheiten/ml auf unter 1 Einheiten/ml neutralisiert. Das Ergebnis, daß mit pCEIL-2 transfizierte COS-7-Zellen Human-IL-2 sekretierten, zeigt klar, daß mit einer rekombinanten DNA transformierte Eukaryontenzellen, die ein für IL-2-Polypeptid kodierendes Gen und eine zur Replikation in diesen Zellen fähige Vektor-DNA enthalten, zur Bildung von IL-2 herangezogen werden können.

Das in *E. coli* HB101 eingebaute Plasmid pCEIL-2 (AJ/2008) erhielt die Hinterlegungsnummer FERM-BP 244.

Beispiel 3

Die konstitutiv IL-2-bildende Zelllinie J-A1886 (ATCC CRL8130), die gemäß Beispiel 1 aus Jurkat-Zellen kloniert worden war, wurde in entsprechender Weise in Rollkulturflaschen gezüchtet. Die gezüchteten Zellen wurden in frischem synthetischem Medium RITC-55-9 mit einer ursprünglichen Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. 8 Stunden nach Züchtungsbeginn wurde eine Extraktion von IL-2-mRNA in Form einer 11- bis 12S-Fraktion aus 3×10^9 Zellen gemäß den in Beispiel 1 beschriebenen Stufen durchgeführt.

Doppelsträngige cDNA wurde gemäß Beispiel 1 synthetisiert, und die cDNA mit mehr als 600 Basenpaaren (2,4 μg) wurde nach Fraktionierung an einem Saccharosedichtegradienten erhalten. Die cDNA wurde sodann mit dCMP-Resten unter Verwendung der terminalen Desoxynucleotidyl-transferase erweitert. Ein Aliquot von 50 ng wurde mit 250 ng dGMP-verlängertem, PstI-gespaltenem pBR322 verschweißt. Die erhaltenen Hybridplasmide wurden zur Transformation von *E. coli* λ 1776 verwendet. Es wurden die Transformanten von etwa 4000 Klonen erhalten. Gemäß dem Verfahren von Grunstein-Hogness wurden 3 mit der als Sonde verwendeten Plasmid-3-16-cDNA komplementäre Klone ausgewählt. Bei den so ausgewählten Klonen handelt es sich um transformierte Klone, die humanes IL-2-Gen besitzen.

Beispiel 4

Ein Plasmid, das die Synthese von Human-IL-2 in *E. coli*-Zellen dirigiert, wurde folgendermaßen konstruiert. Ein Plasmid pTIL2-22 wurde aus pTrS-3 (T. Nishi, T. Taniguchi et al., SEIKAGAKU, Bd. 53 (1981), S. 967)) konstruiert. pIL-2-50A mit einem Gehalt an IL-2-cDNA wurde nach einer Folge von modifizierten Verfahrensweisen gemäß Fig. 5 (a) konstruiert. Ein Plasmid pTrS-3 umfaßt die Insertion des Bereichs des Trp-Promotors und von Shine Dalgarno (kurz SD) zwischen der EcoRI-Stelle und der ClaI-Stelle von pBR322.

Das Plasmid enthält auch ein ATG-Initiationskodon 13 Basenpaare abwärts von der SD-Sequenz sowie eine einzige SphI-Stelle, wie in Fig. 4 erläutert ist. Der Vektor ist ein sehr wirksamer Bildner dieses Proteins, wenn die diesem Protein entsprechende DNA-Sequenz unmittelbar abwärts vom ATG-Kodon, das durch SphI-Spaltung und anschließende Behandlung mit T4-DNA-Polymerase von pTrS-3 erzeugt worden ist, eingesetzt wird. Deshalb wurde das Plasmid pTrS-3 (30 μg) mit dem Restriktionsenzym SphI auf übliche Weise gespalten und anschließend nacheinander mit Phenol und Chloroform behandelt. Die Äthanolpräzipitate wurden gewonnen und beide Enden wurden durch Behandlung mit T4-DNA-Polymerase abgestumpft. Sodann wurde die DNA (21,4 μg) durch entsprechende aufeinanderfolgende Behandlung mit Phenol und Chloroform und Fällung mit Äthanol gewonnen. Andererseits wurden 380 μg pIL-2-50A mit einem Gehalt an IL-2-cDNA mit PstI gespalten. Das IL-2-cDNA-Insert wurde durch Agarosegel-Elektrophorese isoliert. Das cDNA-Insert (11 μg) wurde mit HgiAI gespalten und mit T4-DNA-Polymerase behandelt. 10 μg des größeren DNA-Bruchstücks wurden durch Agarosegel-Elektrophorese isoliert. Gemäß diesem Verfahren erhielt man eine cDNA (7,2 μg), die für 132 Aminosäuren kodiert. Dieses DNA-Fragment wies stumpfe Enden auf (Fig. 5 (a)). Anschließend wurde dieses cDNA-Fragment mit einem pTrS-3-Vektor verknüpft, der vorher unmittelbar abwärts von der ATG-Sequenz mit SphI gespalten und mit T4-DNA-Polymerase behandelt worden war. Dieses verknüpfte Plasmid wurde sodann nach üblichen Verfahren in *E. coli* HB101 transformiert. Die Ligation wurde folgendermaßen durchgeführt. Das größere Fragment von IL-2-cDNA (0,4 μg) und 0,2 μg pTrS-3-Vektor-DNA wurden mit 0,8 Einheiten von T4-DNA-Ligase in 66 millimolar Tris-HCl vom pH-Wert 7,5 mit einem Gehalt an

6,6 millimolar $MgCl_2$, 1 millimolar ATB und 10 millimolar DTT vermischt. Man ließ das Gemisch über Nacht bei 4°C stehen. Unter den auf L-Brühe-Agarplatten mit einem Gehalt an Ampicillin auftretenden Transformanten wurden Kolonien mit einem Gehalt an dem IL-2-cDNA-Bereich, der für 132 Aminosäuren kodiert, durch einen in situ-Kolonienhybridisierungstest ausgewählt. Die ausgewählten Kolonien wurden wieder gezüchtet (10 ml), wonach Plasmid-DNA durch Behandlung mit Lysozym und durch Einfrieren/Auftauen hergestellt wurde. Die Plasmid-DNAs wurden mit PstI und XbaI gespalten. Die erhaltenen Produkte wurden durch Agarosegel-Elektrophorese analysiert, um pTIL-2-22 zu identifizieren, in dem die cDNA der ATG-Sequenz von pTrS-3 in korrekter Orientierung verknüpft war. Das E. coli HB101 mit einem Gehalt an pTIL-2-22 wurde unter herkömmlichen Bedingungen zur Vermehrung der Mikroorganismen gezüchtet. Die Zellen wurden in 10 ml λ -Brühe (2,5 Prozent Bactotrypton, 1,0 Prozent Hefeextrakt, 0,1 Prozent Glucose, 20 millimolar $MgSO_4$, 50 millimolar Tris-HCl, pH-Wert 7,5) mit einem Gehalt an 25 $\mu g/ml$ Streptomycin und 25 μg Ampicillin über Nacht bei 37°C gezüchtet. 1 ml der Kultursuspension wurde auf die gleiche λ -Brühe (100 ml) überimpft und bei 37°C gezüchtet. Sobald die optische Dichte bei 650 nm etwa einen Wert von 1,5 bis 2,0 erreichte, wurde 3-Indolacrylsäure (IAA) zugesetzt. 3 Stunden nach Zugabe des Induktors wurden die Zellen gewonnen, mit 20 millimolar Tris-HCl (pH-Wert 7,5, 30 millimolar NaCl) gewaschen und in 8 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Zur wirksamen Funktionsweise des Trp-Promotors wurden Induktoren, wie IAA, in einer endgültigen Konzentration von 50 $\mu g/ml$ zugesetzt. Die auf diese Weise in den Bakterienzellen gebildeten Proteine wurden durch Ultraschallbehandlung (0°C, 2 min) oder durch Verdauung (0°C, 20 min) mit Lysozym (8 μg) unter anschließendem 3-maligen Einfrieren/Auftauen extrahiert. Nach diesem Verfahren wird IL-2 üblicherweise aus Organismen extrahiert. Die extrahierte IL-2-Aktivität betrug 10 000 bis 120 000 Einheiten/ml. E. coli HB101 mit einem Gehalt an pTIL-2-22 (AJ/2009) wurde unter der Nummer FERM-BP 245 hinterlegt.

Beispiel 5

Ein Plasmid pTuIL-2-22, das IL-2-cDNA trägt, wurde aus pTu-BIP-5 (T. Taniguchi et al., Seikagaku, Bd. 53 (1981), S. 966) und pTIL-2-22 von Beispiel 4, gemäß den in Fig. 7 erläuterten Verfahren konstruiert. Das Plasmid pTuBIP-5 umfaßt die Insertion der Promotorsequenz für tuFB in pBR322. Das Plasmid enthält auch eine einzige ClaI-Stelle, die sich 2 Basenpaare abwärts von der SD-Sequenz befindet, wie in Fig. 7 gezeigt ist. Da pTrS-3 auch eine ClaI-Stelle zwischen der SD-Sequenz und dem ATG-Initiationskodon enthält, und da diese ClaI-Stelle während der Konstruktion des Expressionsplasmids unter Verwendung von pTrS-3 und IL-2-cDNA gemäß Beispiel 4 nicht zerstört wird, ist es sehr einfach, den bakteriellen trp-Promotor durch den von tuFB zu ersetzen, so daß IL-2-cDNA unter der Kontrolle von tuFB-Promotor exprimiert wird.

Daher wurde das Plasmid pTIL-2-22 (30 μg) auf herkömmliche Weise mit den Restriktionsenzymen ClaI und PvuII gespalten. Das Fragment (etwa 2,2 kb) mit einem Gehalt an IL-2-cDNA wurde isoliert und durch Agarosegel-Elektrophorese gereinigt. Man erhielt 3 μg DNA. Andererseits wurden 20 μg pTuBIP-5-Vektor auf entsprechende Weise durch ClaI und PvuII gespalten. Das größere Fragment (etwa 3,4 kb) mit einem Gehalt an dem ampicillinresistenten Gen wurde durch Agarosegel-Elektrophorese isoliert und gereinigt. Man erhielt 3,5 μg DNA. Anschließend wurden diese beiden Fragmente, nämlich das eine (etwa 3,4 kb) mit einem Gehalt an tuFB-Promotor und das andere (etwa 2,2 kb) mit einem Gehalt an IL-2-cDNA auf folgende Weise verknüpft. Das Fragment mit einem Gehalt an IL-2-cDNA (1,2 μg) und 0,3 des Fragments mit einem Gehalt an tuFB-Promotor wurden mit 0,8 Einheiten T4-DNA-Ligase in 66 millimolar Tris-HCl vom pH-Wert 7,5 mit einem Gehalt an 6,6 millimolar $MgCl_2$, 1 millimolar ATP und 10 millimolar DTT vermischt. Das Gemisch ließ man über Nacht bei 4°C reagieren. Das auf diese Weise verknüpfte Plasmid wurde sodann zur Transformation in E. coli HB101 nach üblichen Verfahren verwendet. Unter den auf L-Brühe-Agarplatten mit einem Gehalt an Ampicillin auftretenden Transformanten wurden 8 Kolonien mit einem Gehalt an dem IL-2-cDNA-Bereich, wie pTuIL-2-22 in Fig. 7, ausgewählt. Plasmid-DNA wurde gemäß Beispiel 4 hergestellt. E. coli HB101 mit einem Gehalt an pTuIL-2-22 wurde bei 37°C in 100 ml L-Brühe gezüchtet. Bei Erreichen einer optischen Dichte bei 650 nm von etwa 0,5 bis 1,0 wurden die Bakterienzellen gewonnen, mit 20 millimolar Tris-HCl (pH-Wert 7,5, 30 millimolar NaCl) gewaschen und in 2 ml des gleichen Puffers resuspendiert. Die auf diese Weise erhaltenen Proteine wurden entsprechend Beispiel 4 extrahiert. Die extrahierte IL-2-Aktivität betrug 6000 bis 56 000 Einheiten/ml.

Escherichia coli HB101 mit einem Gehalt an pTuIL-2-22 (AJ12010) wurde unter der Nummer FERM-BP 246 hinterlegt.

Beispiel 6

Ein Plasmid pGIL-2-22, das IL-2-cDNA trägt, wurde aus pGL 101 (T. M. Roberts und G. D. Laucer, Meth. Enzym., Bd. 68 (1979), S. 473-483) und pTIL-2-22 von Beispiel 4 konstruiert.

Das Plasmid pGL 101 (20 μg) mit einem Gehalt an einem lac-Promotor wurde mit dem Restriktionsenzym PvuII auf herkömmliche Weise gespalten. Durch anschließende Behandlung mit Phenol, Chloroform und Äthanol fällung erhielt man 17 μg DNA. Ferner wurden 75 μg pTIL-2-22 mit ClaI und SalI gespalten. Nach Agarosegel-Elektrophorese erhielt man 2,2 μg eines DNA-Fragments mit einem Gehalt an IL-2-cDNA. Dieses Fragment wurde durch Behandlung mit DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) abgestumpft. Die beiden erhaltenen Fragmente (0,25 μg und 0,66 μg) wurden mit 1,0 Einheit T4-DNA-Ligase gemäß Beispiel 5

verknüpft. Das verknüpfte Plasmid wurde auf herkömmliche Weise zur Transformation in *E. coli* HB101 verwendet. Unter den Transformanten wurden die Transformanten, die die Insertion des *Cla*I-*Sal*I-Fragments mit einem Gehalt an IL-2-cDNA als Sonde besaßen, in λ -Brühe (10 ml) mit einem Gehalt an 25 μ g/ml Ampicillin gezüchtet. Die Herstellung von Plasmid-DNA erfolgte gemäß Beispiel 4. Die Plasmid-DNA mit der Initiationssequenz ATG von IL-2-cDNA unmittelbar abwärts vom *lac*-Promotor wurde durch Spaltung mit *Pst*I und *Xba*I erhalten.

Das auf diese Weise erhaltene pGIL-2-22 wurde auf 100 ml L-Brühe mit einem Gehalt an 25 μ g/ml Ampicillin und 25 μ g/ml Streptomycin überimpft und gezüchtet. Nach Erreichen einer optischen Dichte bei 650 m μ von etwa 0,5 wurde Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) in einer Konzentration von 1 millimolar zugesetzt. 1 Stunde später wurden die Bakterienzellen gesammelt. Die Zellextrakte wurden gemäß Beispiel 5 hergestellt. Die extrahierte IL-2-Aktivität betrug 6000 bis 80 000 Einheiten/ml.

Escherichia coli HB101 mit einem Gehalt an pGIL-2-22 (AJ12011) wurde unter der Nummer FERM-BP 247 hinterlegt.

Beispiel 7

10 μ g des Plasmids pTrS-3 wurden zunächst mit dem Restriktionsenzym *Sal*I gespalten. Die *Sal*I-Stelle wurde durch Behandlung mit DNA-Polymerase (Klenow-Fragment) oder mit T4-DNA-Polymerase abgestumpft. Nach der Spaltung mit *Cla*I wurde ein größeres Fragment, das den *trp*-Promotorbereich enthielt, durch Agarosegel-Elektrophorese auf übliche Weise isoliert. Man erhielt 3 μ g DNA.

Ferner wurden 11 μ g eines cDNA-Inserts, das durch *Pst*I-Spaltung von pIL2-50A erhalten worden war, mit *Hgi*AI gespalten und mit T4-DNA-Polymerase behandelt. Das größere Fragment wurde isoliert und durch Agarosegel-Elektrophorese gereinigt. Somit wurde ein für 132 Aminosäuren von IL-2-kodierendes dDNA-Fragment in einer Menge von 7,2 μ g erhalten. Anschließend wurden 0,45 μ g des Fragments mit einem Gehalt an einem *trp*-Promotor (wie vorstehend beschrieben), 0,5 μ g *Hgi*AI-*Pst*I-Fragment mit einem Gehalt an IL-2-cDNA und synthetische Oligonucleotide (5')-CGATAAGCTATGGCA-(3') und (3')-TATTCGATACCGT-(5') (jeweils 20 pMol), die beide am 5'-Ende phosphoryliert waren, mit 1 Einheit T4-DNA-Ligase gemäß Beispiel 4 (vgl. Fig. 5 (b)) verknüpft.

Das auf diese Weise verknüpfte Plasmid wurde sodann zur Transformation von *E. coli* HB101 verwendet. Unter den aufgetretenen Transformanten wurden die gewünschten Transformanten folgendermaßen ausgewählt.

Die gewünschten Transformanten, die zur Hybridisierung mit IL-2-cDNA und synthetischen Oligonucleotiden in der Lage sind, wurden zunächst gemäß dem Kolonienhybridisierungsverfahren ausgewählt. Anschließend wurden die Transformanten, die die Insertion des DNA-Fragments beginnend von der CCT-Sequenz in Stellung 111 bis 113 in Fig. 2 (a) (CCTACT----) unmittelbar abwärts der ATG GCA-Sequenz besaßen, durch *Pst*I- und *Xba*I-Spaltung ausgewählt.

Die vorstehende Transformante, die pTIL2-21a oder pTIL2-21b enthielt, wurde gemäß Beispiel 4 in L-Brühe gezüchtet. Hohe Aktivitäten an IL-2 wurden in den Zellextrakten der Transformanten beim Test gemäß Beispiel 4 festgestellt.

Escherichia coli HB101 mit pTIL2-21a (AJ 12013) und *Escherichia coli* HB101 mit pTIL2-21b (AJ 12014) wurden unter den Nummern FERM-BP 248 und FERM-BP 249 hinterlegt.

Die Wirte, *E. coli* λ 1776 und HB101 (H. W. Boyer et al., *J. Mol. Biol.*, Bd. 41 (1969), S. 459, die in den vorstehenden Beispielen verwendet wurden, sind bekannt und frei zugänglich. Ferner können die Wirte aus den hinterlegten Transformanten durch Züchtung dieser Transformanten in L-Brühe bei 37°C erhalten werden, um die entsprechenden rekombinanten DNAs in den Transformanten freizusetzen. Anschließend werden Stämme, die gegenüber Tetracyclin und Ampicillin empfindlich sind, als Wirte ausgewählt.

Die Plasmidvektoren pBR322 (Handelsprodukt der Bethesda research Laboratory), pCE-1, pTrS-3 und pGL101 sind bekannt und frei zugänglich. Ferner können die Plasmidvektoren aus den hinterlegten Transformanten erhalten werden, indem man die rekombinanten Plasmid-DNAs in den Transformanten auf herkömmliche Weise abtrennt und die Plasmidvektoren auf entsprechende Weise, wie in den Beispielen beschrieben, abtrennt. Beispielsweise läßt sich pCE-1 erhalten, indem man pCEIL-2 durch *ps*tI spaltet und das gebildete größere DNA-Fragment abtrennt. Ferner wurden pTrS-3 und pTuBIP-5 als *E. coli* FERM-BP 328 (= FERM-P6735) und *E. coli* ATCC 31871 (s. EP-A 64681) hinterlegt.

5

PATENTANSPRÜCHE

10 1. DNA-Sequenz, die eine DNA-Sequenz umfaßt, welche für ein Polypeptid mit der Aktivität von menschlichem Interleukin-2 kodiert, wobei dieses Polypeptid aus der nachstehenden Gruppe ausgewählt ist:

a) ein Polypeptid, das die nachstehende Aminosäuresequenz aufweist:

15

1
Met-Tyr-Arg-Met-Gln-Leu-Leu-Ser-Cys-Ile-Ala-Leu-Ser-Leu-
20
Ala-Leu-Val-Thr-Asn-Ser-Ala-Pro-Thr-Ser-Ser-Ser-Thr-Lys-
Lys-Thr-Gln-Leu-Gln-Leu-Glu-His-Leu-Leu-Leu-Asp-Leu-Gln-
20 Met-Ile-Leu-Asn-Gly-Ile-Asn-Asn-Tyr-Lys-Asn-Pro-Lys-Leu-
Thr-Arg-Met-Leu-Thr-Phe-Lys-Phe-Tyr-Met-Pro-Lys-Lys-Ala-
Thr-Glu-Leu-Lys-His-Leu-Gln-Cys-Leu-Glu-Glu-Leu-Lys-
Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-Leu-Ala-Gln-Ser-Lys-Asn-Phe-
His-Leu-Arg-Pro-Arg-Asp-Leu-Ile-Ser-Asn-Ile-Asn-Val-Ile-
25 Val-Leu-Glu-Leu-Lys-Gly-Ser-Glu-Thr-Thr-Phe-Met-Cys-Glu-
Tyr-Ala-Asp-Glu-Thr-Ala-Thr-Ile-Val-Glu-Phe-Leu-Asn-Arg-
153
Trp-Ile-Thr-Phe-Cys-Gln-Ser-Ile-Ile-Ser-Thr-Leu-Thr

30 b) ein Polypeptid, dem gegenüber (a) eine oder mehrere Aminosäuren fehlen;

c) ein Polypeptid, in dem gegenüber (a) eine oder mehrere Aminosäuren ausgetauscht sind;

35 d) ein Fusions-Polypeptid, welches ein Polypeptid gemäß (a), (b) oder (c) enthält, in welchem die zusätzlich verknüpften Aminosäuren die biologische Interleukin-2-Aktivität nicht stören oder leicht eliminiert werden können,

e) ein Polypeptid, welches ein allelisches Derivat eines Polypeptids gemäß (a) darstellt.

40 2. DNA-Sequenz, die eine DNA-Sequenz umfaßt, welche für ein Polypeptid mit der Aktivität von menschlichem Interleukin-2 kodiert, wobei das kodierte Polypeptid ausgewählt ist unter

a) einem Polypeptid mit der nachstehenden Aminosäuresequenz:

45

X-Thr-Ser-Ser-Ser-Thr-Lys-Lys-Thr-Gln-Leu-Gln-Leu-Glu-
His-Leu-Leu-Leu-Asp-Leu-Gln-Met-Ile-Leu-Asn-Gly-Ile-Asn-
Asn-Tyr-Lys-Asn-Pro-Lys-Leu-Thr-Arg-Met-Leu-Thr-Phe-Lys-
Phe-Tyr-Met-Pro-Lys-Lys-Ala-Thr-Glu-Leu-Lys-His-Leu-Gln-
Cys-Leu-Glu-Glu-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Glu-Glu-Val-Leu-Asn-
50 Leu-Ala-Gln-Ser-Lys-Asn-Phe-His-Leu-Arg-Pro-Arg-Asp-Leu-
Ile-Ser-Asn-Ile-Asn-Val-Ile-Val-Leu-Glu-Leu-Lys-Gly-Ser-
Glu-Thr-Thr-Phe-Met-Cys-Glu-Tyr-Ala-Asp-Glu-Thr-Ala-Thr-
Ile-Val-Glu-Phe-Leu-Asn-Arg-Trp-Ile-Thr-Phe-Cys-Gln-Ser-
Ile-Ile-Ser-Thr-Leu-Thr,

55

worin X für Ala-Pro, Pro, Met-Ala-Pro oder Met-Pro steht,

b) einem Polypeptid, welches ein allelisches Derivat des Polypeptids (a) ist,

60 c) einem Fusionspolypeptid, welches ein Polypeptid gemäß (a) enthält, in welchem die zusätzlich verknüpften Aminosäuren die biologische Aktivität nicht stören oder leicht entfernt werden können.

3. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder 2, welche Restriktionsendonuclease-Schnittstellen hat, die, vom 5'-Terminus der kodierenden Sequenz an, in der Reihenfolge Bst NI, Xba I und Bst NI liegen.
- 5 4. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1 oder 2, welche Restriktionsendonuclease-Schnittstellen hat, die, vom 5'-Terminus der kodierenden Sequenz an, in der Reihenfolge Dde I, Hinf I, Bst NI, Xba I, Bst NI und Sau 3A liegen.
- 10 5. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, deren Basensequenz bei A in Position 1 beginnt und die aufeinanderfolgenden Basen bis mindestens zu der ACT-Sequenz in Position 504 bis 506 in Fig. 2 (a) aufweist.
6. DNA-Sequenz nach Anspruch 1, deren Basensequenz bei der ATG-Sequenz in Position 48 bis 50 beginnt und die im Anschluß an die ATG-Sequenz aufeinanderfolgenden Basen bis mindestens zu der ACT-Sequenz in Position 504 bis 506 in Fig. 2 (a) aufweist.
- 15 7. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, deren Basensequenz an der GCA-Sequenz in Position 108 bis 110 beginnt und die im Anschluß an die GCA-Sequenz aufeinanderfolgenden Basen mindestens bis zu der ACT-Sequenz in Position 504 bis 506 in Fig. 2 (a) aufweist.
- 20 8. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, deren Basensequenz an der CCT-Sequenz in Position 111 bis 113 beginnt und die im Anschluß an die CCT-Sequenz aufeinanderfolgenden Basen bis mindestens zu der ACT-Sequenz in Position 504 bis 506 in Fig. 2 (a) aufweist.
- 25 9. DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 5 bis 8, deren Basensequenz an der ACT-Sequenz in Position 504 bis 506 in Fig. 2 (a) endet.
10. DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 5 bis 8, deren Basensequenz an der TGA-Sequenz in Position 507 bis 509 in Fig. 2 (a) endet.
- 30 11. DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 5 bis 8, deren Basensequenz bei C in Position 801 in Fig. 2 (a) endet.
12. DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 5 bis 8, deren Basensequenz bei Poly (A) in Fig. 2 (a) endet.
- 35 13. DNA-Sequenz gemäß Anspruch 1, welche die in Fig. 2 (a) gezeigte Basensequenz aufweist.
14. Durch Rekombination hergestellte DNA, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 in einer Vektor-DNA, die zur Replikation in einer Prokaryoten- oder Eukaryoten-Zelle befähigt ist, in der die kodierende DNA-Sequenz in einer Position stromabwärts von einer Promotor-Sequenz angeordnet ist.
- 40 15. Rekombinante DNA gemäß Anspruch 14, in der die Prokaryoten-Zelllinie dem Genus *Escherichia*, vorzugsweise *Escherichia coli* angehört.
16. Rekombinante DNA gemäß Anspruch 14, in der die Eukaryoten-Zelllinie dem Genus *Saccharomyces* angehört und vorzugsweise *Saccharomyces cerevisiae* angehört.
- 45 17. Rekombinante DNA gemäß Anspruch 14, in der die Eukaryoten-Zelllinie eine mit SV-40 transformierte Affenzelle ist, die konstitutiv Large T-Antigen exprimiert.
- 50 18. Durch Rekombination hergestellte DNA gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16, die befähigt ist, in einem geeigneten Wirt den cDNA-Abschnitt, der für reifes menschliches Interleukin-2-polypeptid kodiert, jedoch nicht den Abschnitt, der der Signalsequenz entspricht, zu exprimieren.
19. Eukaryoten- oder Prokaryoten-Zellen, die mit einer rekombinanten DNA gemäß einem der Ansprüche 14 bis 16 oder 18 transformiert ist.
- 55 20. Zelle gemäß Anspruch 19, wobei die Prokaryoten-Zelle dem Genus *Escherichia*, vorzugsweise *Escherichia coli*, angehört und mit der rekombinanten DNA gemäß Anspruch 14, 15 oder 18 transformiert ist.
- 60 21. Zelle gemäß Anspruch 19, wobei die Eukaryoten-Zellen dem Genus *Saccharomyces*, vorzugsweise *Saccharomyces cerevisiae*, angehört und mit der rekombinanten DNA gemäß Anspruch 14, 16 oder 18 transformiert ist.

22. Zelle gemäß Anspruch 19, wobei die Eukaryoten-Zelle eine Säugetierzelle ist.

23. Zelle gemäß Anspruch 22, wobei die Säugetierzelle eine mit SV-40 transformierte Affenzelle ist, die konstitutiv Large T-Antigen exprimiert.

5

24. Verfahren zur Herstellung von menschlichem Interleukin-2, bei dem in einem Kulturmedium eine Eukaryoten- oder Prokaryoten-Zelle, die mit einer rekombinanten DNA transformiert ist, kultiviert wird, um Interleukin-2 zu produzieren, und das gebildete Interleukin-2 gewonnen wird, **dadurch gekennzeichnet**, daß die rekombinante DNA eine DNA-Sequenz gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13 in einer Vektor-DNA enthält, die zur Replikation in dieser Zelle befähigt ist, wobei die kodierende Sequenz dieser DNA-Sequenz in einer Position stromabwärts von einer Promotorsequenz angeordnet ist.

10

25. Verfahren nach Anspruch 24, **dadurch gekennzeichnet**, daß die Eukaryoten- oder Prokaryoten-Zelle, die mit einer rekombinanten DNA zur Bildung von Interleukin-2 transformiert ist, eine Zelle oder eine Zelllinie gemäß einem der Ansprüche 19 bis 23 ist.

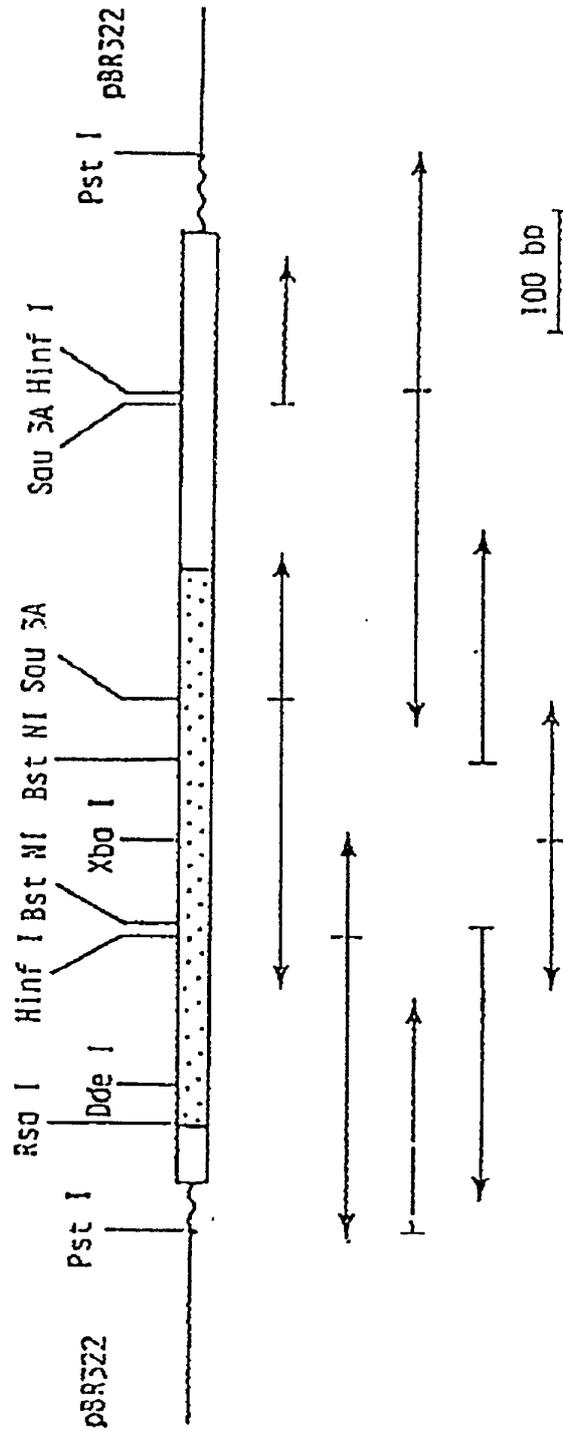
15

20

Hiezu 12 Blatt Zeichnungen

25

Figur 1



Ausgegeben 25.01.1991
Blatt 4

Int. Cl.⁵: C12N 15/26
C07H 21/04
C12N 5/10
C12P 21/00
//(C12N 5/10; C12R 1:19)

Figur 2 (b)

Aminosäuresequenz I

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu Val Thr Asn
Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu
Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr
Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu
Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser
Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu
Glu Leu Lys Gly Ser Glu Tyr Thr Phe Met Cys Glu Thr Ala Asp Glu Thr Ala Thr
Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu
Thr

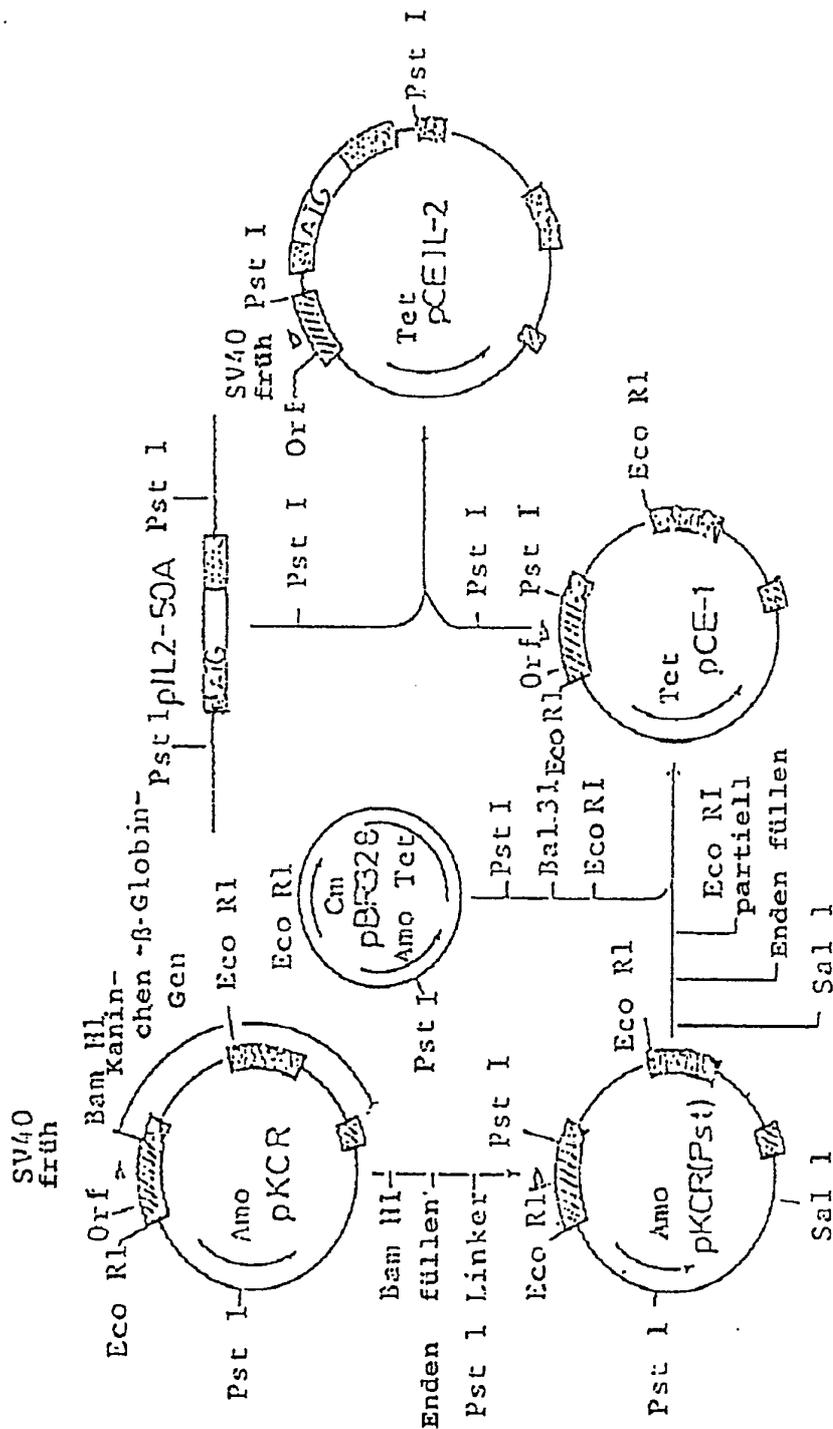
Aminosäuresequenz II

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg
Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln
Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys
Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu
Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ile Val Glu
Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

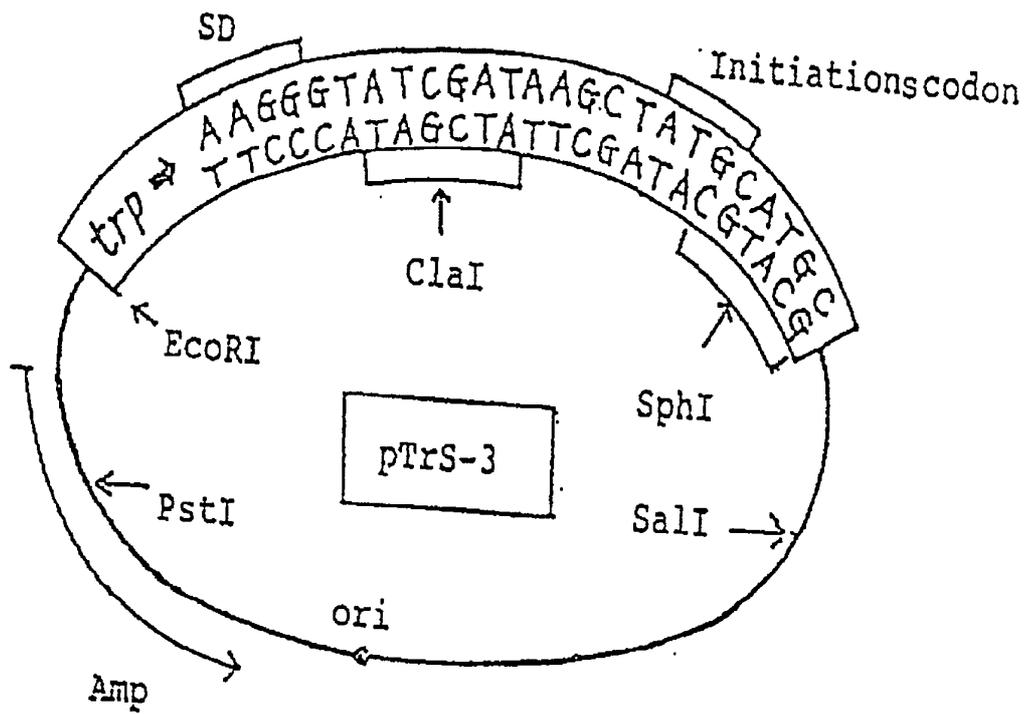
Aminosäuresequenz III

Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met
Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys
Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn
Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr

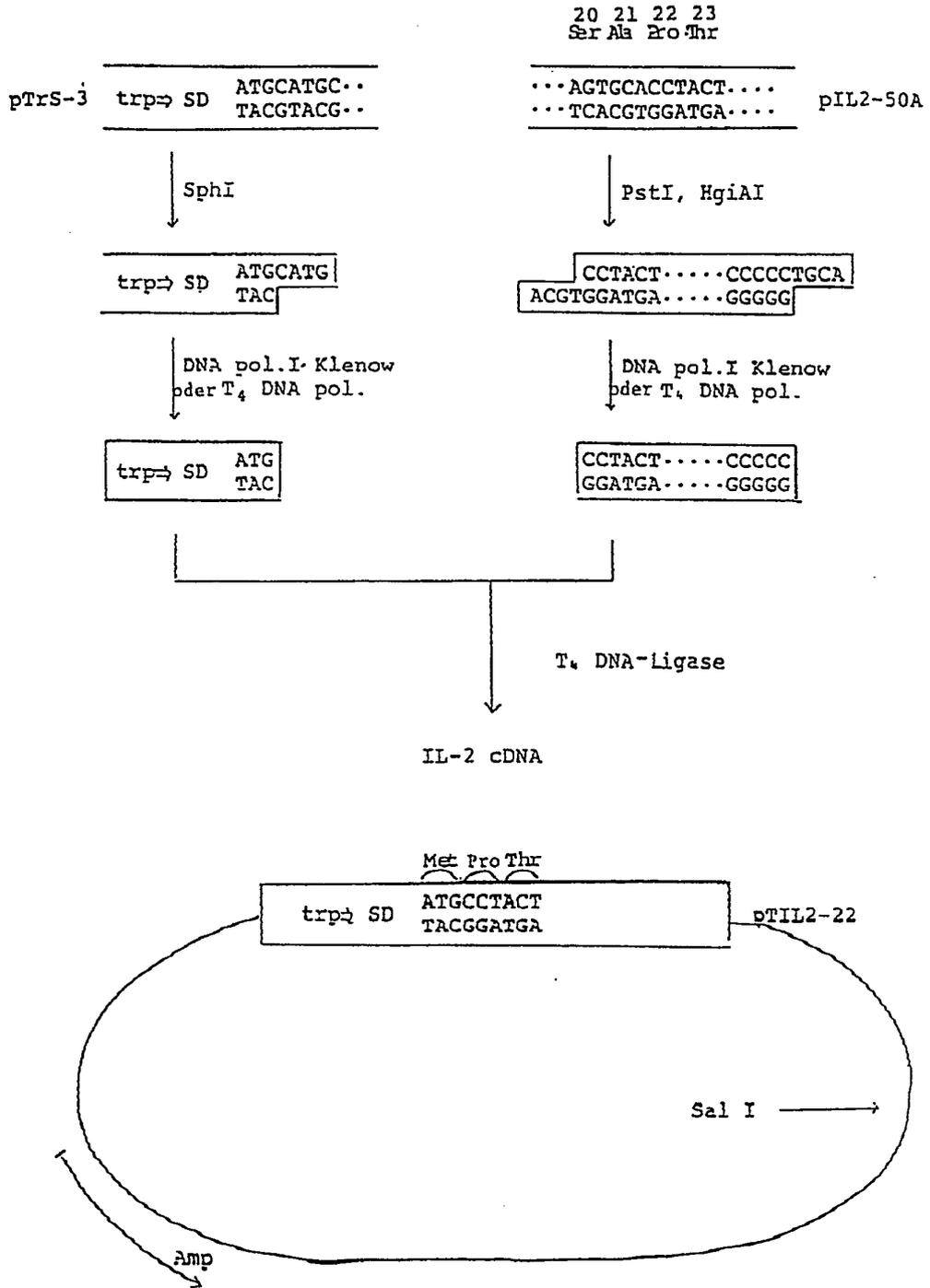
Figur 3



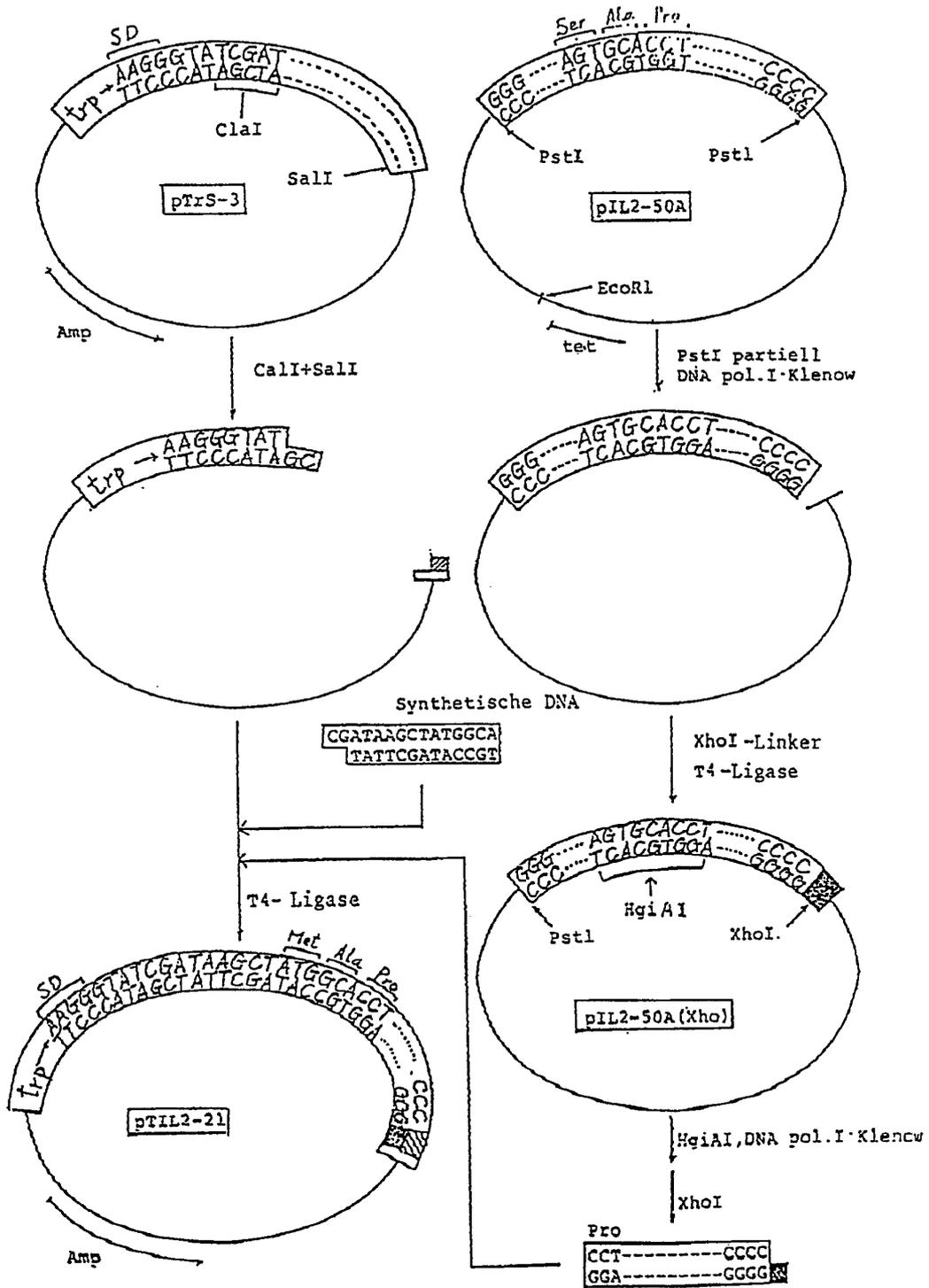
Figur 4



Figur 5(a)



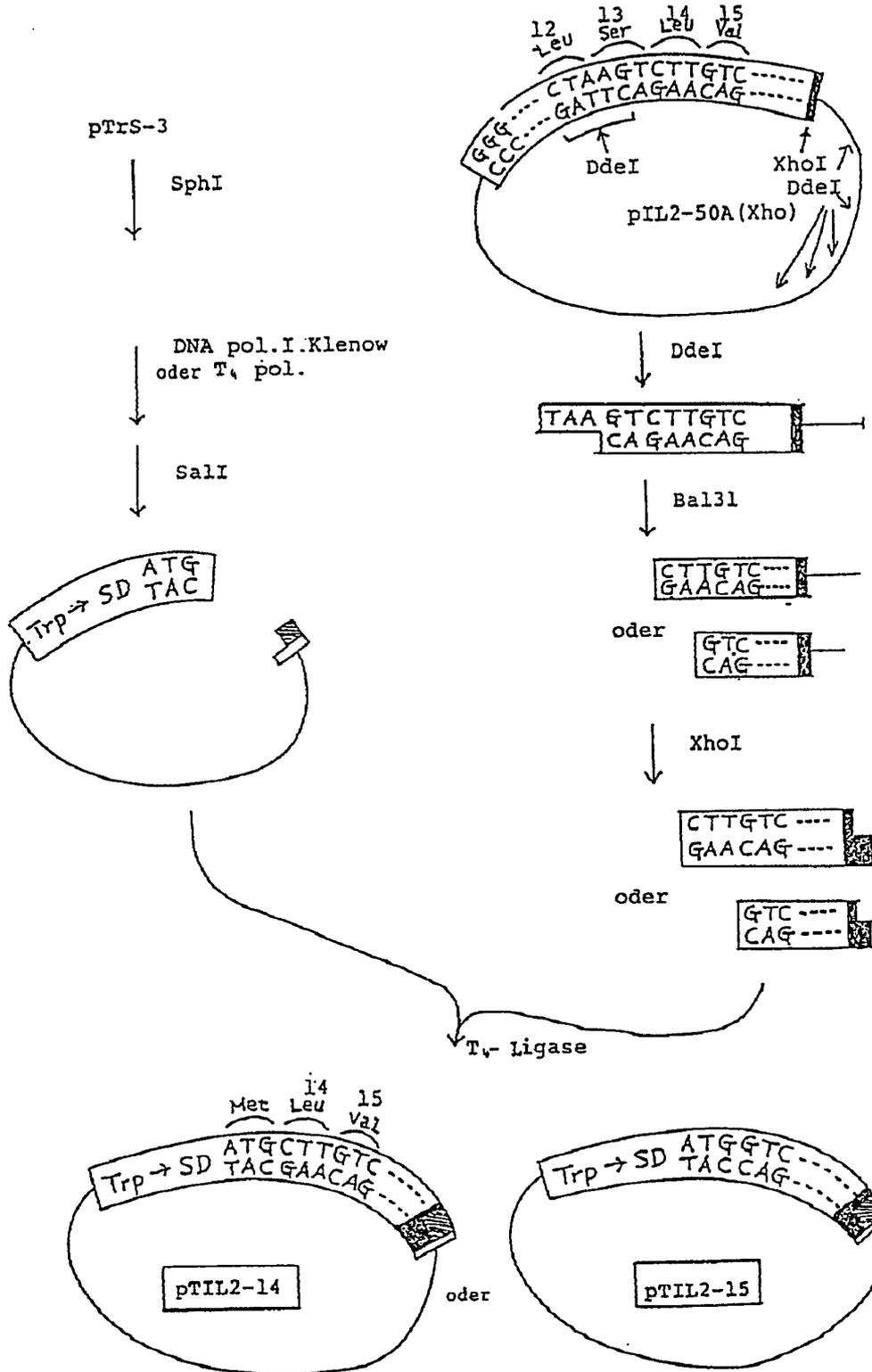
Figur 5 (b)



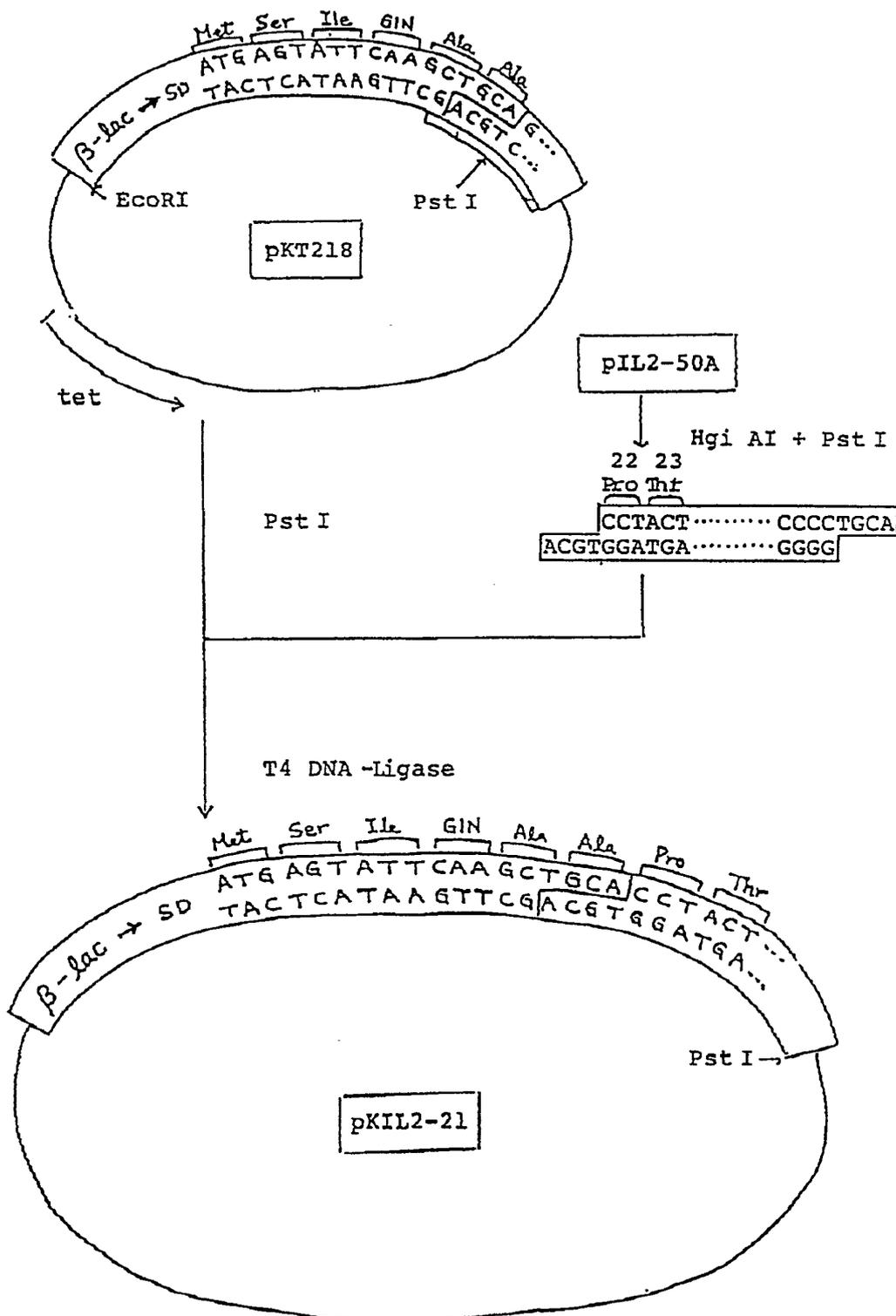
Ausgegeben 25. 01.1991
Blatt 9

Int. Cl.⁵: C12N 15/26
C07H 21/04
C12N 5/10
C12P 21/00
//(C12N 5/10; C12R 1:19)

Figur 5(c)



Figur 6



Figur 7

