



NORGE

(12) PATENT

(19) NO

(11) 301482

(13) B1

(51) Int Cl⁶ C 07 K 14/54, C 12 N 15/24

Patentstyret

(21) Søknadsnr	915116	(86) Int. inng. dag og søknadsnummer	13.06.90, PCT/US90/03345
(22) Inng. dag	27.12.91	(85) Videreføringsdag	27.12.91
(24) Løpedag	13.06.90	(30) Prioritet	30.06.89, US, 374667
(41) Alm. tilgj.	28.02.92		
(45) Meddelt dato	03.11.97		

(73) Patenthaver	Immunex Corp, 51 University Street, Seattle, WA 98101, US
(72) Oppfinner	David L. Urdal, Seattle, WA, US Helmut Sassenfeld, Bainbridge Island, WA, US
(74) Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, 0306 OSLO

(54) Benevnelse **Fremgangsmåte for fremstilling av rensset rekombinant human-IL-3-analogprotein som omfatter Met³huIL-3(Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰), isolert DNA-sekvens, rekombinant ekspressjonsvektor og gjærvertscelle**

(56) Anførte publikasjoner WO 8805469

(57) Sammendrag

Farmasøytisk preparat som omfatter som aktive bestanddeler visse forkortede, rensede human-IL-3-(Pro⁸-Asp¹⁵Asp⁷⁰)-analogproteiner uttrykt av transformert gjær av arten *Saccharomyces cerevisiae*, som ved tilførsel til en primat ikke gir påvisbar neslefeber.

Oppfinnelsens bakgrunn

Foreliggende oppfinnelse gjelder fremgangsmåte for fremstilling av et rensset rekombinant human-IL-3-analogprotein som omfatter Met³huIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰) med gunstige kliniske og toksikologiske egenskaper sammenlignet med huIL-3-proteiner fremstilt i *E. coli*. Videre gjelder oppfinnelsen isolert DNA-sekvens, rekombinant ekspresjonsvektor og gjærvertscelle for anvendelse ved fremgangsmåten.

Differensiering og proliferasjon av hematopoietiske celler reguleres av utskilte glykoproteiner kjent under fellesbetegnelsen kolonistimulerende faktorer (CSF). I systemer hos mus og menneske omfatter disse proteiner granulocyt-makrofagkolonistimulerende faktor (GM-CSF), som fremmer produksjon av granulocytter og makrofager i normal benmarg og som videre ser ut til å regulere aktiviteten av modne, differensierte granulocytter og makrofager. Andre CSF omfatter makrofag-CSF (M-CSF eller CSF-1), som induserer selektiv proliferasjon av makrofager og granulocyt-CSF (G-CSF), som induserer utvikling av granulocytforløpere fra forstadier i benmarg. Ytterligere en CSF, først isolert fra musesystemer og senere med humane celler som kilde, er blitt kalt IL-3 eller multi-CSF.

Muse-IL-3 ble opprinnelig identifisert av Ihle et al., *J. Immunol.* 126:2184 (1981), som en faktor som induerte ekspresjon av et T-celleassosiert enzym, 20 α -hydroksysteroiddehydrogenase. Faktoren ble rensset til homogenitet og vist å regulere vekst og differensiering av en rekke subklasser av tidlige hematopoietiske og lymfoide forløperceller. cDNA-kloner som tilsvarte muse-IL-3, ble først isolert av Fung et al., *Nature* 307:233 (1984), og Yokota et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1070 (1984). Genomiske DNA-homologer av muse-IL-3-sekvensen fra gibbonape og menneske ble beskrevet av Yang et al., *Cell* 47:3 (1986). Den humane sekvens beskrevet av Yang et al. omfattet en serinrest i posisjon 8 i den modne proteinsekvens. Etter dette funn rapporterte tre grupper isolering av Pro⁸huIL-3-cDNA, omfattende Dorssers et al., *Gene* 55:115 (1987); Otsuka et al., *J. Immunol.* 140:2288 (1988); og Gillis et al., *Behring Inst. Mitt.* 83:1 (1988).

En undersøkelse av individer for å bestemme frekven-

sen av Pro⁸-allelet ble beskrevet av Gillis et al., se ovenfor. I dette arbeidet ble polymerasekjedereaksjonen benyttet til amplifisering av DNA-sekvensene som flankerer posisjon 8-locuset. Radioaktivt merkede oligonukleotidprober komplementære til Ser⁸- og Pro⁸-formene ble så benyttet til analyse av amplifisert DNA isolert fra 13 genetisk ubeslektede individer. Amplifisert DNA ble immobilisert på nitrocellulose og analysert ved hybridisering under betingelser med økende stringens. Resultatene viste at alle de 13 undersøkte personer var positive for DNA som koder for Pro⁸-versjonen av huIL-3. Tre var i tillegg positive for Ser⁸huIL-3 i dette locus (dvs. at de var heterozygoter), noe som indikerer et moderat polymorfinitivå for det humane IL-3-gen i den analyserte populasjon.

Prekliniske og kliniske undersøkelser av humane IL-3-proteiner fremstilt av forskjellige produsenter har avslørt overraskende forskjeller i klinisk anvendelighet og toksisitet. Utvikling av ikke-giftige, tolererbare former av humant IL-3 til terapeutisk bruk er viktig, da rekombinant, humant IL-3 synes å være det første cytokin som kan stimulere granulopoiese, erytropoiese og, mest viktig, trombopoiese in vivo.

Alvorlig giftighet av rIL-3 ble beskrevet av Valent et al., ved "First International Symposium: Cytokines in Hemopoiesis, Oncology and AIDS", holdt i Hannover, Forbundsrepublikken Tyskland, 14.-17. juni 1989. Et huIL-3(Ser⁸)-preparat fremstilt i E. coli ble vurdert in vivo ved tilførsel til rhesusaper (n = 10) tre ganger daglig ved forskjellige doser (0, 11, 33 og 100 µg/kg/dag, s.c.) i 14 dager med påfølgende tilførsel av GM-CSF (dagene 14-28, 5 µg/kg tre ganger daglig). Alle aper responderte på rhuIL-3 med en 2-3 gangers økning av hvite blodceller (WBC) ved dag 14 grunnet økning av eosinofiler og basofiler. Intracellulært histamin (IH) i WBC ble vist å øke kontinuerlig etter IL-3-behandling frem til dagene 8-10. Dette overskudd av IH ble fulgt av en økning av histaminverdier i plasma og et neslefeberlignende utslett som tydet på infiltrering av mastceller og lymfocytter i dermis, observert i hudbiopsiprøver. De kliniske bivirkninger av dette rhuIL-3-preparat ble tilskrevet aktivering av basofiler og mastceller og de histaminproduserende virkninger av dette cytokin.

I motsetning til dette ga analogproteinet fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse ingen påvisbar neslefeber eller stimulering av mastcelle- eller lymfocytteinfiltrering i dermis ved tilførsel til cynomolgusaper eller humane pasien-
5 ter. Resultatene av disse toksikologiske og kliniske undersøkelser gis i eksemplene.

Sammendrag av oppfinnelsen

Foreliggende oppfinnelse tilveiebringer en frem-
10 gangsmåte for fremstilling av et rensset rekombinant human-IL-3-analogprotein som omfatter Met³huIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰), og fremgangsmåten er kjennetegnet ved at en gjærvertscelle som inneholder en ekspresjonsvektor omfattende en DNA-sekvens som koder for human-IL-3-analogproteinet, dyrkes under betingelser
15 som fremmer ekspresjon av proteinet.

Ved tilførsel til primater gir ikke slike analogproteiner påvisbar neslefeber eller mastcelle- og lymfocytteinfiltrasjon i dermis.

Videre tilveiebringer oppfinnelsen en isolert DNA-sekvens kjennetegnet ved at den koder for et human-IL-3-analogprotein fremstilt ifølge krav 1, en rekombinant ekspresjonsvektor kjennetegnet ved at den omfatter en DNA-sekvens ifølge krav 3 og en gjærvertscelle kjennetegnet ved at den inneholder en ekspresjonsvektor ifølge krav 4.
25

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

huIL-3-analogproteinene fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse omfatter utvalgte, forkortede huIL-3-analogproteiner med små variasjoner i den N-terminale ende sammenlignet
30 med det native protein. Slike forkortede proteiner ble påvist som bestanddeler i proteinblandinger fremkommet ved ekspresjon av cDNA som koder for modne huIL-3-proteiner i S. cerevisiae, antagelig som et resultat av proteolyse av gjærekspresjonsverten. Disse blandinger kan inneholde ett eller flere humane
35 IL-3(Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰)-analogproteiner med N-terminal ende ved Met³, Thr⁴ eller Thr⁶ i den følgende aminosyresekvens (de alternative N-terminale ender er understreket):

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

Begrepet rhuIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰) betegner et rekombi-
 nant, humant interleukin-3-polypeptid med en prolinrest i
 15 posisjon 8 og asparaginsyrerester i posisjonene 15 og 70, hvor
 rest 1 viser til den første aminosyre i det modne, native
 eller villtypehumane interleukin-3. Aminosyresekvensen til et
 slikt polypeptid er vist ovenfor. De forskjellige N-terminale
 arter angis ved å benevne den N-terminale rest foran begrepet
 20 "rhuIL-3", f.eks. Met³rhuIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰). Analogproteinene
 fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse har en asparagin-
 syrerest (Asp) som erstatning for hver asparaginrest i N-
 glykosyleringssetene som finnes i den native, humane IL-3-sek-
 vens for å forhindre N-glykosylering av gjærverten i disse
 25 seter.

Et DNA-segment som koder for humant IL-3, ble isolert
 fra et cDNA-bibliotek som beskrevet i den eksperimentelle av-
 deling nedenfor. Setespesifikk oligonukleotidmutagenese ble så
 utført for å fremskaffe et cDNA som koder for humant IL-3
 30 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰). Det resulterende endrede cDNA ble benyttet til
 fremstilling av en gjærekspresjonsvektor som ble benyttet til
 transformering av en passende gjærekspresjonsstamme som ble
 dyrket i kultur under betingelser som fremmer derepressering
 av gjærpromotoren. Det resulterende protein ble så rensset ved
 35 en kombinasjon av reversfase-høytytende væskechromatografi
 (RPHPLC) og ionebytterchromatografi slik at et rensset produkt
 ble beholdt. Analyse av dette produkt ved hjelp av et analyse-
 system for proliferasjon av human benmarg og ved analyse av
 binding til human IL-3-reseptor bekreftet ekspresjon av et

analogprodukt egnet til farmasøytisk bruk i mennesket. N-terminal sekvensering av produktet viste en blanding av analogproteiner med lette variasjoner fra parti til parti. For å oppnå et preparat med i det vesentlige en enkelt art, Met³huIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰), ble en ny ekspresjonsvektor fremstilt hvor sekvensen som koder for ledersekvensen for sekresjon i gjær, ble direkte satt inn i samme leseramme slik at et konstrukt som mangler kodonene for de første to aminosyrer i det modne protein, mangler.

10 Preparater som inneholder analogproteiner fremstilt ifølge oppfinnelsen, består fortrinnsvis i det vesentlige av Met³huIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰). Hvis en ekspresjonsvektor som koder for det modne protein i sin hele lengde benyttes, erholdes imidlertid en blanding som består av Ala¹-huIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰)
15 blandet med ett eller flere proteiner valgt fra den foregående gruppe, typisk bestående av:

(a) fra tilnærmet 30 til tilnærmet 40 % Ala¹huIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰),

(b) fra tilnærmet 10 til tilnærmet 30 % Met³huIL-3
20 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰), og

(c) en restfraksjon som i det vesentlige består av en blanding av Thr⁴- og Thr⁶huIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰).

Preparater som inneholder analogproteiner fremstilt ifølge oppfinnelsen viser fortrinnsvis en spesifikk biologisk
25 aktivitet på fra tilnærmet 1,8 til tilnærmet 7,0 x 10⁷ U/mg i analysesystemet med human benmarg, fortrinnsvis 4,0 til tilnærmet 7,0 x 10⁷ U/mg, og en bindingsaffinitet til humane IL-3-reseptorer fra monocytter, uttrykt som en inhiberingskonstant, på fra tilnærmet 2,0 til tilnærmet 8,0 x 10¹⁰ M⁻¹, fortrinnsvis
30 fra tilnærmet 4,0 til tilnærmet 8,0 x 10¹⁰ M⁻¹. Det innses at mindre fraksjoner (mindre enn 1 mol%) av rhuIL-3-proteiner med andre N-terminale ender også kan være til stede i blandingene ifølge foreliggende oppfinnelse.

35 1. Analyser av biologisk aktivitet for huIL-3

Analysen benyttet til måling av biologisk aktivitet for huIL-3 er beskrevet nedenfor.

A. Proliferasjonsanalyse med human benmarg

Nyisolerte humane benmargsceller preinkuberes i

2 timer ved 37 °C og 5 % CO₂ i vevsdyrkingsflasker med 2 x 10⁶ celler pr. ml forvarmet og forgasset, serumfritt RPMI 1640-medium (Gibco, Chagrin Falls, OH, USA) med 50 enheter/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin og 300 µg/ml fersk L-glutamin (heretter kalt "analysemedium"). Etter preinkubasjonen fjernes ikke-adherente celler ved forsiktig pipettering av mediet over flaskens overflate. Ikke-adherente celler oppsamles ved sentrifugering ved 1000 rpm i 10 minutter ved 4 °C, resuspenderes i et lite volum analysemedium med 10 % føtalt, bovint serum (FBS) og telles ved hjelp av trypanblått for viabilitetsanalyse og Turks farge for gjenvinning av hvite celler. Cellene oppbevares ved tilnærmet 4 °C i analysemedium med 10 % FBS inntil de tilsettes analyseskålene.

50 µl analysemedium tilsettes hver brønn i en 96-brønners flatbunnet vevsdyrkingsplate. 50 µl prøve fortynnet i analysemedium tilsettes den første brønn i hver rad, og seriefortynninger utføres over hver rad på vanlig måte. 1,25 x 10⁴ benmargsceller i et volum på 100 µl tilsettes så hver brønn. Platene inkuberes i 4 dager ved 37 °C og 5 % CO₂ i en plastikkboks med sterilt, destillert H₂O for å forhindre uttørking. På dag 4 tilsettes 25 µl analysemedium med 5 % FBS og 80 µCi/ml [³H]-thymidin (80 Ci/mmol) til hver brønn, og platen inkuberes i 5 timer ved 37 °C og 5 % CO₂ i en plastikkboks. Etter inkuberingen høstes cellene på glassfiberfiltre, vaskes og analyseres for inkorporert radioaktivitet med en scintillasjonteller. Enheter av huIL-3-aktivitet beregnes ved referanse til den mengde huIL-3 som induserer 50 % av maksimal thymidininkorporering. Hvis f.eks. en 100 µl prøve gir halvparten av maksimal thymidininkorporering ved en fortykning på 1:20, defineres 1 enhet som aktiviteten i 1/20 av 100 µl, eller 5 µl. Prøven vil således inneholde 1000 delt på 5, eller 200 enheter pr. ml (U/ml) med huIL-3-aktivitet.

B. Analyse av binding til human IL-3-reseptor

I en 96-brønners, rundbunnet mikrotiterplate fremstilles ti 2-gangers fortyninger av hver prøve i RPMI 1640-medium med utgangskonsentrasjon 0,075 µg/ml (50 µl hver). For hver analyseplate settes 50 µl aliquoter av rhuIL-3-standarder (1,5 µg/ml) og negative kontroller (bindingsmedium) opp i triplikat. I forbindelse med denne analysen betyr "bindings-

medium" RPMI 1640 med 2,5 % (vekt/vol) bovint serumalbumin (BSA), 0,2 % (vekt/vol) natriumazid og 20 mM HEPES, pH 7,2. 50 μ l 125 I-merket rhuIL-3-lagerløsning (1×10^9 M i bindingsmedium, spesifikk aktivitet $4-8 \times 10^{15}$ cpm/mmol), fremstilt som

5 beskrevet i PCT-søknad US 89/02599, tilsettes så hver brønn, fulgt av 50 μ l humane monocytter (høstet fra kultur ved sentrifugering, vasket to ganger med RPMI 1640 og resuspendert ved 4×10^7 celler/ml i bindingsmedium). Hver plate inkuberes så i 1 time ved 37  C på en rotatorisk ristemaskin under

10 kraftig sammenblanding. Etter inkubasjonen skilles celler og bundet 125 I-rhuIL-3 fra ubundet 125 I-rhuIL-3 ved en ftalat-oljesentrifugeringsteknikk utført som følger. Først fjernes 65 μ l aliquoter i duplikat fra hver inkubasjonsblanding, og hver aliquot legges på toppen av 200 μ l kald ftalat-oljeblanding

15 [1,5 deler dibutylftalat, 1 del bis(-2-etylheksyl)-ftalat (Eastman Kodak Co., Rochester, NY)] i 400 μ l polyetylensentrifuger r og sentrifugeres i 1 minutt i en mikrosentrifuge ved 8  C. Cellene pluss bundet 125 I-rhuIL-3 sedimenterer gjennom ftalat-oljeblandingens mens det mindre tette bindingsmediet med

20 ubundet 125 I-rhuIL-3 gjenblir på overflaten. 125 I-rhuIL-3 bundet til celler måles ved   kutte rørene i to og måle 125 I i topp og bunn. Resultatene av analysen av binding til IL-3-reseptor uttrykkes som inhibering (%) beregnet i henhold til ligning 1 nedenfor:

25

$$\text{Ligning 1} \quad I (\%) = \frac{100 \times (\text{maks} - \text{test})}{(\text{maks} - \text{min})}$$

30 hvor maks er nivået av binding av 125 I-IL-3 i nærvær av medium alene, min er nivået av binding i nærvær av 1,5 μ g/ml umerket, og test er bindingsniv et i nærvær av fortyninger av analyseprøver. Resultatene analyseres ved ikke-lineær, minste kvadraters tilpasning, ligning 2 nedenfor:

35

$$\text{Ligning 2} \quad M (\%) = \frac{M \cdot K_i \cdot I}{1 + K \cdot C + K_i \cdot I}$$

av dataene uttrykt i den form som gitt i 1 hvor M (%) er det maksimale inhiberingsniv , K (M^{-1}) er bindingskonstanten for

^{125}I -rhuIL-3, C (M) er konsentrasjonen av ^{125}I -rhuIL-3, I (M) er konsentrasjonen av analyseprøven, og K_i (M^{-1}) er inhiberings- (bindings)konstanten for analyseprøven. K_i -verdiene for analyseprøver skaleres relativt til en rhuIL-3-standard ved å dividere $[K_i/K_s]$, hvor K_s er inhiberingskonstanten for standarden slik at en relativ bindingsaktivitet oppnås.

2. Ekspresjon av protein i rekombinante gjærssystemer

Rekombinante *Saccharomyces cerevisiae* vertsceller benyttes til ekspresjon av de rekombinante proteiner fremstilt ifølge foreliggende oppfinnelse. Foretrukne ekspresjonsvektorer kan avledes fra pBC102-K22 (ATCC 67255) som inneholder DNA-sekvenser fra pBR322 for seleksjon og replikasjon i *E. coli* (Ap^r -genet og replikasjonsorigo) og gjær-DNA-sekvenser omfattende en glukoserepresserbar alkoholdehydrogenase 2 (ADH2)-promotor. ADH2-promotoren er blitt beskrevet av Russel et al., *J. Biol. Chem.* 258:2674 (1982) og Beier et al., *Nature* 300:724 (1982). Plasmid pBC102-K22 inneholder også et *Trp1*-gen som selekterbar markør og replikasjonsorigo fra 2 μ -plasmidet i gjær. Ved siden av promotoren sitter ledersekvensen for gjær- α -faktor som tillater utskillelse av heterologe proteiner fra en gjærvert. Ledersekvensen for α -faktor er modifisert slik at den nær sin 3' ende inneholder et *Asp718*-restriksjonssete (*KpnI* og *Asp 718* er isoskismere) for å lette fusjon av denne sekvens til fremmede gener. En sekvens som koder for aminosyrene Glu-Ala-Glu-Ala, ble utelatt for å tillate effektiv prosessering av utskilt protein, som beskrevet av Brake et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:4642 (1984).

Alternative ekspresjonsvektorer er gjærvektorer som inneholder en α -faktorpromotor, f.eks. p $\text{Y}\alpha\text{HuGM}$ (ATCC 53157), som inneholder villtypen av det humane GM-CSF-gen. Andre er kjent for fagfolk. Oppbyggingen av p $\text{Y}\alpha\text{HuGM}$ er beskrevet i den publiserte europeiske patentsøknad nr. 183.350 (8530682.7), beskrivelsen i hvilken inkorporeres heri ved referanse.

Valg av passende gjærstammer for transformering vil avgjøres av de selekterbare markørers natur og andre egenskaper ved vektoren. Passende *S. cerevisiae*-stammer for transformering med ekspresjonsvektorer avledet fra pBC102-K22 eller

pYaHuGM omfatter stamme X2181-1B, tilgjengelig fra Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, CA, USA (se nedenfor) med genotypen *atrp1 gall adel his2*; J17 (ATCC 52683; *ahis2 adel trp1 met14 ura3*); og IL166-5B (ATCC 46183; *ahis1 trp 1*). En spesielt foretrukket ekspresjonsstamme for bruk med pBC102-K22, XV2181 er en diploid dannet ved kryssing av to haploide stammer, X2181-1B, tilgjengelig fra Yeast Genetic Stock Center, Department of Biophysics and Medical Physics, University of California, Berkeley, CA 94702, USA; og XV617-1-3B, tilgjengelig fra Department of Genetics, University of Washington, Seattle, WA 98105, USA, eller Immunex Corporation, 51 University Street, Seattle, WA 98101, USA. En egnet transformeringsmetode er den beskrevet av Hinnen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:1929 (1978), som selekterer for Trp⁺-transformanter i et selektivt medium som består av 0,67 % gjærnitrogenbase, 0,5 % kasaminosyrer, 2 % glukose, 10 µg/ml adenin og 20 µg/ml uracil.

Vertsstammer transformert med vektorer som inneholder ADH2- eller α -faktorpromotorer dyrkes for ekspresjon i et rikt medium som består av 1 % gjærekstrakt, 2 % pepton og 1 % glukose tilsatt 80 µg/ml adenin og 89 µg/ml uracil. Derepresering av ADH2-promotoren oppnås når glukosen i mediet er oppbrukt. Urensede gjær supernatanter høstes ved filtrering og fryses eller lagres ved 4 °C forut for videre rensing.

25

3. Rensing av IL-3

Rekombinant huIL-3 oppnådd ved fermentering av gjærstammer kan renses ved en enkelt eller på hverandre følgende reversfase-HPLC-trinn på en preparativ HPLC-kolonne ved metoder analoge til dem beskrevet av Urdal et al., J. Chromatog. 296:171 (1984) og Grabstein et al., J. Exp. Med. 163:1405 (1986). En foretrukket rensingsprotokoll er beskrevet i eksempel 2 nedenfor.

35 Eksperimentell diskusjon

Eksempel A

Isolering av cDNA som koder for huIL-3

Lymfocytter fra perifert blod ble isolert fra "buffy

coats" fremstilt fra helblod (Portland Red Cross, Portland, Oregon, USA) ved Ficoll-hypaque-tetthetssentrifugering. T-celler ble isolert ved rosetting med 2-aminoetyltiouronium-bromidbehandlede røde blodceller fra sau. Celler ble dyrket i flasker på 175 cm² med 5 x 10⁶ celler/ml i 18 timer i 100 ml RPMI, 10 % føtalt kalveserum, 50 µM β-merkaptoetanol, 1 % fytohemagglutinin (PHA) og 10 ng/ml forbol-12-myristat-13-acetat (PMA). RNA ble ekstrahert ved guanidin-CsCl-metoden og poly A⁺-RNA fremstilt ved oligo-dT-cellulosekromatografi (Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982). cDNA ble fremstilt fra poly A⁺-RNA i det vesentlige som beskrevet av Gubler og Hoffman, Gene, 25:263-269 (1983). cDNA ble gjort dobbelttrådet med DNA-polymerase I, buttendet med T4-DNA-polymerase, metylert med EcoRI-metylase for beskyttelse av EcoRI-kløvingssteder i cDNA og ligert til EcoRI-linkere. Disse konstrukter ble kuttet med EcoRI for å fjerne alle unntatt én kopi av linkeren i hver ende av cDNA, ligert til EcoRI-kuttete og defosforylerte armer av bakteriofag λgt10 (Huynh et al., DNA Cloning: A Practical Approach, Glover, red. IRL Press, s. 49-78), pakket med λ-fagekstrakter (Stratagene, San Diego, CA, USA) i henhold til produsentens instruksjoner. 500.000 rekombinanter ble utsådd på *E. coli*-stamme C600hf1⁻ og analysert ved standard "plakk"-hybridiseringsteknikker ved bruk av følgende prober.

To oligonukleotider ble syntetisert med sekvenser komplementære til utvalgte 5'- og 3'-sekvenser i huIL-3-genet. Den 5' probe som er komplementær til en sekvens som koder for en del av ledersekvensen til huIL-3, hadde sekvensen 5'-GAG-TTGGAGCAGGAGCA-GGAC-3'. Den 3'-probe, som tilsvarende et område som koder for aminosyrer 123-130 i det modne protein, hadde sekvensen 5'-GATCGCGAGGCTCAAAGTCGT-3'. Syntesemetoden var en standard automatisert triestermetode i det vesentlige lik den beskrevet av Sood et al., Nucl. Acids Res. 4:2557 (1977) og Hirose et al., Tet. Lett. 28:2449 (1978). Etter syntesen ble oligonukleotidene avblokkert og rensset ved preparativ gelelektroforese. For bruk som analyseprober ble oligonukleotidene radioaktivt endemerket med ³²P-ATP og T4-polynukleotidkinase ved bruk av teknikker lik dem beskrevet av Maniatis et al. *E.*

coli-stammen benyttet for analyse av biblioteket var C600hfl⁻ (Huynh et al., 1985, supra).

Tretten positive "plakk" ble rensset og probet på nytt og uavhengig med de to hybridiseringsprober. Elleve kloner
5 hybridiserte til begge de to oligonukleotidene. cDNA-innskuddene fra en rekke positive rekombinante fager ble subklonet i et EcoRI-kuttet derivat (pGEMBL18) av standardkloningsvektoren pBR322 med en polylinker med et unikt EcoRI-sete, et BamHI-sete og en rekke andre unike restriksjonsseter. Et eksempel på
10 en vektor av denne type, pEMBL, er beskrevet av Dente et al., Nucl. Acids Res. 11:1645 (1983) i hvilken promotorene for SP6- og T7-polymerase flankerer de mange kloningsseter. Nukleotid-sekvensen av utvalgte kloner ble bestemt ved hjelp av kjedetermineringsmetoden. Nærmere beskrevet gav delvis EcoRI-
15 kutting av IGT10:IL-3 kloner 2, 3, 4 og 5, fragmenter med størrelser fra 850 basepar til 1000 basepar som ble separat subklonet inn i EcoRI-setet i pGEMBL18. Innskuddene i pGEMBL:rhuIL-3-subklonene ble sekvensert ved bruk av en universell primer som bindes ved siden av det multiple klonings-
20 sete i pGEMBL18, og syntetiske oligonukleotidprimere avledet fra huIL-3-sekvensen.

Eksempel 1

Modifisering av N-glykosyleringsseter kodet for av huIL-3-cDNA
25 og sammensetning av ekspresjonsvektor for rhuIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵-Asp⁷⁰)

De to asparaginknyttede glykosyleringsseter som finnes i det naturlige protein (Asn¹⁵ og Asn⁷⁰), ble endret ved å forandre kodonene i disse posisjoner til kodoner som koder
30 for asparaginsyre. Dette hindrer N-bundet glykosylering (ofte hyperglykosylering) av det utskilte protein av gjærcellene, slik at et mer homogent produkt erholdes. Disse endringer ble gjort som beskrevet nedenfor etter subkloning av huIL-3-cDNA inn i gjærekspresjonsvektoren pIXY120.

35 Gjærekspresjonsvektoren pIXY120 er i det vesentlige identisk med pBC102-K22, beskrevet i EPA 243.153, bortsett fra at følgende syntetiske oligonukleotid med multiple kloningsseter ble satt inn fra Asp718-setet (aminosyre 79) nær den 3'

ende av α -faktorsignalpeptidet til SpeI-setet som finnes i
2 μ -sekvensene:

```

Asp718
GTACCTTTGGATAAAAAGAGACTACAAGGACGACGATG-
GAAACCTATTTTCTCTGATGTTCCCTGCTGCTAC-
                    NcoI
5 -ACAAGAGGCCTCCATGGATCCCCCGGGACA
  -TGTTCTCCGGAGGTACCTAGGGGGCCCTGTGATC
                    ↑BamHI                    SpeI

```

I tillegg ble et 514 basepar stort DNA-fragment av-
ledet fra den enkelttrådete bakteriofag f1 med replikasjons-
origo og den intergeniske region innsatt ved NruI-setet i pBR-
322-DNA-sekvensene. Nærvar av f1-replikasjonsorigo tillater
dannelse av enkelttrådete kopier av vektoren ved transforma-
sjon inn i passende (hannlige) stammer av *E. coli* og super-
infeksjon med bakteriofag f1. Denne evne enkler DNA-sekven-
sering av vektoren og tillater muligheten av *in vitro*-muta-
genese.

Gjærekspresjonsvektoren pIXY120 ble kuttet med res-
triksjonsenzymene Asp718, som kløver nær den 3' ende av α -
faktorlederpeptidet (nukleotid 237), og BamH1, som kløver i
polylinkeren. Det store vektorfragment ble rensset og ligert
til følgende DNA-fragmenter: (1) et huIL-3-cDNA-fragment av-
ledet fra plasmid GEMBL18:huIL-3 fra ClaI-setet (nukleotid 58
i modent huIL-3) til BamH1-setet (3' for huIL-3-cDNA i en
polylinker); og (2) følgende syntetiske oligonukleotidlinker
A:

```

GTA CCT TTG GAT AAA AGA GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG GCT CCC ATG
GA AAC CTA TTT TCT GTG ATG TTC CTG CTG CTA CTG TTC CGA GGG TAC

```

```

ACC CAG ACG ACG CCC TTG AAG ACC AGC TGG GTT GAT TGC TCT AAC ATG AT
TGG GTC TGC TGC GGG AAC TTC TGG TCG ACC CAA CTA ACG AGA TTG TAC TAG C

```

30

Oligonukleotid A gjendanner sekvensen som koder for
den C-terminale ende av α -faktorlederpeptidet og fuserer det i
leserammen med oktapeptidet DYKDDDDK, som i sin tur fuseres
til den N-terminale ende av modent rhuIL-3. Denne fusjon til
rhuIL-3-proteinet tillater påvisning med antistoff spesifikt
for oktapeptidet og ble opprinnelig benyttet for måling av
ekspresjon og rensing av rhuIL-3. Dette oligonukleotid koder
også for en aminosyreforandring i posisjon 15 (Asn¹⁵ til Asp¹⁵)

for å endre dette N-knyttede glykosyleringssete. De understrekte nukleotider i oligonukleotid A representerer forandringer fra villtype-cDNA-sekvensen. Bare A til G- og C til T- endringene ved hhv. nukleotid 43 og 45 (telt fra kodonet som
5 tilsvarer det N-terminale alanin i det modne huIL-3-molekyl) resulterer i en aminosyreendring (Asp¹⁵). De øvrige baseendringer introduserer nyttige restriksjonssteder (AhaII og PvuII) uten å endre aminosyresekvensen. Det resulterende plasmid ble kalt pIXY139 og inneholder et rhuIL-3-cDNA med én gjenværende
10 konsensussekvens for N-bundet glykosylering (Asn⁷⁰).

Plasmid pIXY139 ble benyttet for utførelse av oligonukleotidstyrt mutagenese for å fjerne den andre konsensussekvens for N-bundet glykosylering ved endring av Asn⁷⁰ til Asp⁷⁰. *In vitro*-mutagenesen ble utført ved en metode lik den
15 beskrevet av Walder og Walder, *Gene* 42:133 (1986). Gjørvektoren pIXY139 inneholder replikasjonsorigo for den enkelttrådede bakteriofag f1 og er i stand til å danne enkelttrådet DNA ved nærvær i en egnet (hannlig) stamme av *E. coli* ved superinfeksjon med hjelperfag.

20 Enkelttrådet DNA ble dannet ved å transformere *E. coli*-stamme JM107 og superinfeksjon med hjelperfagen IR1. Enkelttrådet DNA ble isolert og annealet til følgende mutagene oligonukleotid B, GTC AAG AGT TTA CAG GAC GCA TCA GCA AAT G, som tilveiebringer en kodonendring som substituerer Asn med
25 Asp i posisjon 70 i modent huIL-3. Annealings- og gjørtransformeringsbetingelser ble utført som beskrevet av Walder og Walder, *supra*. Gjørtransformanter ble selektert ved dyrking i medium som manglet tryptofan, slått sammen i puljer og DNA ekstrahert som beskrevet av Holm et al., *Gene* 42:169 (1986).
30 Dette DNA som inneholdt en blanding av villtype- og mutert plasmid-DNA, ble benyttet til transformering av *E. coli* RR1 til ampicillinresistens. De oppnådde kolonier ble analysert ved hybridisering til radioaktivt merket oligonukleotid B ved bruk av gjengse teknikker. Plasmider som inneholdt DNA som
35 koder for huIL-3 Asp⁷⁰, ble identifisert ved hybridisering til radioaktivt merket oligonukleotid B under stringente betingelser og bekreftet ved nukleotidsekvensering.

Det resulterende gjærekspresjonsplasmid ble kalt

pIXY138 og inneholdt huIL-3-genet som koder for Asp¹⁵- og Asp⁷⁰-aminosyreendringene og oktapeptidet DYKDDDDK i den N-terminale ende. Det endelige gjærekspresjonsplasmid er identisk med pIXY138, bortsett fra at det mangler nukleotidsekvensene som koder for oktapeptidet og følgelig gir modent rhuIL-3 som produkt.

Det endelige gjærekspresjonsplasmid ble fremstilt som beskrevet nedenfor. Gjærekspresjonsvektoren pIXY120 ble kuttet med restriksjonsenzymene Asp718 og BamH1, som beskrevet ovenfor. Det store vektorfragment ble ligert sammen med (1) et huIL-3-cDNA-fragment avledet fra plasmid pIXY138, som strakk seg fra AhaII-setet (som kløver ved nukleotid 19 i modent huIL-3) til BamH1-setet 3' for cDNA, og (2) følgende syntetiske oligonukleotid C:

15 GTA CCT TTG GAT AAA AGA GCT CCC ATG ACC CAG ACG A
 GA AAC CTA TTT TCT CGT GGG TAC TGG GTC TGC TGC
 Pro Leu Asp Lys Arg Ala Pro Met Thr Gln Thr Thr

Oligonukleotid C gjendanner den 3' ende av α -faktorlederpeptidet fra Asp718-setet (aminosyrene Pro-Leu-Asp-Lys-Arg) og de N-terminale 7 aminosyrer i huIL-3 til AhaII-setet. Det resulterende plasmid ble kalt pIXY151. I gjær tillater denne vektor glukoseregulert ekspresjon og utskillelse av rhuIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰). For å tilveiebringe relativt homogene preparater som i det vesentlige består av Met³rhuIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰), ble en lignende ekspresjonsvektor kalt pIXY290 fremstilt ved å bruke et oligonukleotid identisk med oligonukleotid C, men uten kodonene som spesifiserer Ala- og Pro-restene til stede i det native, humane IL-3-protein. Ved transfeksjon inn i en egnet vert, som så dyrkes under passende betingelser, er denne vektor i stand til å dirigere ekspresjon av rhuIL-3-preparater som i det vesentlige består av Met³rhuIL-3(Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰)-produktet (se eksempel 3 nedenfor).

Eksempel 2

35 Ekspresjon og rensing av rhuIL-3(Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰)-blanding

Vertsstammen XV2181, en diploid *S. cerevisiae*-stamme ble dannet ved krysning av XV617-1-3B [α , his6, leu2-1, trp1-1, ura3, ste5] erholdt fra University of Washington, Depart-

ment of Genetics Yeast Strain Bank, Seattle, WA, USA, og X2181-1B [α , trp1-1, gall, adel, his2] erholdt fra Yeast Genetic Stock Center, University of California, Berkeley, CA, USA. Vertsstammen transformeres med ekspresjonsplasmidet
5 ifølge fremgangsmåten til Sherman et al., Laboratory Course Manual for Methods i Yeast Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1986.

Gjær med ekspresjonsplasmid pIXY151 (se eksempel 1 ovenfor) oppbevares på YNB-trp-agarskåler lagret ved 4 °C. En
10 forkultur startes ved inokulering av flere isolerte rekombinante gjærkulturer i 1 liter YNB-trp-medium (6,7 g/l gjærnitrogenbase, 5 g/l kasaminsyrer, 40 mg/l adenin, 160 mg/l uracil og 200 mg/l tyrosin) og dyrkes over natten i to 2-liters flasker ved 30 °C under kraftig risting. Om morgenen
15 er kulturen mett, i stasjonær fase, ved en OD₆₀₀ på 2 til 7. De på forhånd rensede og steriliserte fermentorer (tre maskiner med 10 liters arbeidsvolum) fylles til 80 % av sin arbeidskapasitet med SD-2-medium (4,0 g/l ammoniumsulfat, 3,2 g/l monobasisk kaliumfosfat, 3,0 g/l gjærekstrakt, 1,0 g/l
20 sitronsyre, 0,1 g/l natriumklorid, 5 ml/l 2 % kalsiumklorid, 2,5 ml/l vitamin 101-løsning, 0,5 ml/l sporelementløsning, 0,5 ml/l 20 % magnesiumsulfat, 2,0 ml/l glukose) og holdes ved 30 °C med røring ved 500-600 rpm og 10-16 l/minutt luftgjennomstrømning. Forkulturen tilsettes. Etter 2 timers dyrking
25 begynnes næringstilførsel i form av 50 % glukose med en hastighet hvorved 50 g/l tilsettes over et tidsrom på 10-12 timer. Næringstilførselen endres så til 50 % etanol tilsatt med 30-40 ml/time inntil høsting.

Det totale tidsforløp for fermenteringen er tilnærmet
30 20 timer, hvorefter den optiske tetthet (600 nm) varierer mellom 30 og 45. Fermentorene kjøles så ned til 20 °C, pH i gjærbrygget justeres til 8,0 ved tilsetning av 5 M NaOH, og det resulterende materiale filtreres gjennom et Millipore Pellicon-filtersystem utstyrt med en 0,45 µm filterkassett og
35 oppsamles i en steril 10 liters glassballong.

Det rhuIL-3 som forefinnes i gjærbrygget, påsettes en 5 cm x 30 cm kolonne pakket med 15-20 µm C-4 reversfasekisel (Vydac, Separations Group, Hesperia, CA, USA) ved å pumpe det filtrerte gjærbrygg direkte på kolonnen. Kolonnen ekvilibrerer

med 0,1 % trifluoreddiksyre i vann (løsemiddel A) forut for påsetting av gjærbrygget og vaskes med dette løsemiddel etter påsettingen av brygget på søylen inntil den optiske absorbans av det eluerte materiale nærmer seg baselinjeverdier. Etter

5 dette etableres en gradient av 0,1 % trifluoreddiksyre i acetonitril (løsemiddel B) fra 0 % B til 100 % B ved en endringshastighet på 2 % B pr. minutt og en strømningshastighet på 100 ml/minutt. En pause på 5 minutter når gradienten når 30 % B, er programmert inn i gradientkontrollenheten.

10 20 minutter etter start av gradienten oppsamles fraksjoner på 1 minutt. Aliquoter av fraksjonene analyseres for proteininnhold ved en fluorescaminanalyse med bovint serumalbumin (BSA) som standard. rhuIL-3 viste seg å elueres i fraksjoner 8, 9 og 10. Fraksjonene med rhuIL-3 fra første trinn lagres

15 ved 4 °C i polyetylenflasker inntil tilnærmet 1 g totalprotein erholdes. Til det sammenslåtte protein tilsettes to volumer 0,1 % trifluoreddiksyre i vann. Denne løsning pumpes så på en ny 5 cm x 30 cm kolonne pakket med 15-20 µ C-18-kisel (Vydac, Separations Group, Hesperia, CA, USA) som er ekvilibrert med

20 løsemiddel A (0,1 % TFA i vann). Etter påsetting av materialet vaskes kolonnen med løsemiddel A, hvoretter en gradient identisk med den beskrevet ovenfor etableres med en hastighetsforandring på 1 % løsemiddel B pr. minutt og med en strømningshastighet på 100 ml/minutt. Fraksjoner oppsamles hvert

25 0,4 minutt 24 minutter inn i gradienten. Aliquoter av fraksjonene analyseres for proteininnhold ved fluorescaminanalysen med BSA som standard.

Toppfraksjoner fra C-18-kolonnen slås sammen og 1/10 volum 0,5 M β-alanin, pH 3,6, tilsettes. En prøve tas ut,

30 hvoretter de sammenslåtte fraksjoner påsettes en 10 ml "S-Sepharose"-kolonne (1 cm x 10 cm, Pharmacia) ved en strømningshastighet på 5 ml/minutt. Etter påsetting av prøven vaskes kolonnen med 50 ml 10 mM tris, pH 7,4, og IL-3 elueres med en lineær gradient fra 10 mM tris, pH 7,4, til 200 mM

35 tris, pH 7,4 (200 ml totalt gradientvolum). Toppfraksjoner med rhuIL-3 slås så sammen og dialyseres mot 100 mM tris, pH 7,4, over natten ved 4 °C og sterilfiltreres.

De biologiske aktiviteter (enheter/mg) og bindingsaffinitetene til tre produksjonspartier med rhuIL-3, fremstilt

i det vesentlige som beskrevet ovenfor, ble bestemt. Bindingsaffiniteten ble fastsatt ved bestemmelse av inhiberingskonstanter (K_i) med rensede proteiner. Resultatene er gitt i tabell I nedenfor. I tabell I er alle verdier uttrykt som gjennomsnittet for prøver analysert i triplikate i to separate analyser.

rhuIL-3 fra disse tre partier (AZZ-0001-0003) ble også gjort gjenstand for proteinsekvensering ved Edman-degradering og den integrerte verdi (pmol) av hver PTH-aminosyre rest sammenlignet med den kjente proteinsekvens. En kurve for hver av de foreliggende sekvenser ble erholdt ved lineær regresjonsanalyse og benyttet til å anslå forekomsten (%) av hver sekvens i preparatet. Resultatene er gitt nedenfor.

Tabell I

N-terminal sammensetning, spesifikk aktivitet og bindingsaffinitet av rhuIL-3-produksjonspartier

Parti ($\times 10^{10}$ M ⁻¹)	Mol%				Spesifikk aktivitet ($\times 10^7$ U/mg)	Bindingsaffinitet
	Art					
	Ala ¹	Met ³	Thr ⁴	Thr ⁶		
AZZ-0001	34	23	31	12	4,5	5,58
AZZ-0002	35	15	11	39	5,6	7,14
AZZ-0003	37	18	14	31	5,0	5,95

Eksempel 3

Fermentering og rensing av Met³rhuIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰)

Ekspresjonsvektoren pIXY290 (se eksempel 1 ovenfor) ble transfektert inn i *S. cerevisiae*-produksjonsstammen XV2181 i det vesentlige som beskrevet for pIXY151 i eksempel 2.

Et inokulum ble fremstilt ved inokulering av 0,5 ml av et frosset glyserolforråd av produksjonsstammen i en 6 liters flaske med (a) 500 ml av et gjær dyrkingsmedium som inneholdt pr. liter sterilt H₂O: 20,0 g (NH₄)₂SO₄, 5,0 g KH₂PO₄, 1,0 g MgSO₄·7 H₂O, 0,1 g CaCl₂·2 H₂O, 10,0 g kaseinhydrolysat, 20,0 g glukose og 20,0 g galaktose; (b) 0,5 ml av en sporsaltblanding som inneholdt pr. liter sterilt H₂O: 5,0 g borsyre,

2,0 g kobbersulfat, 10,0 g jern(III)klorid, 10,0 g mangansulfat, 0,5 g natriummolybdat, 1,0 g sink sulfat, 0,5 g koboltklorid og 100 ml 6 N HCl; og (c) 0,5 ml av en vitaminløsning som inneholdt pr. liter sterilt H₂O: 1,0 ml av en 0,2 % løsning av biotin, 1,0 g kalsiumpantotenat, 25,0 g myo-inositol, 5,0 g niacin, 0,4 g pyridoxin-HCl, 0,1 g folsyre og 0,5 g cholin-klorid. Denne inokuleringskulturen ble inkubert ved 30 °C i en rotatorisk ristemaskin ved 250 rpm i tilnærmet 24 timer.

En 10 liters fermentor ble forberedt til fermentering ved å fylles med 7,5 l deionisert H₂O med 50 g monobasisk kaliumfosfat, 200 g ammoniumsulfat, 10 g MgSO₄·7 H₂O, 1,0 g CaCl₂·2 H₂O og 2 ml av et overflateaktivt stoff med antiskumdannende virkning. Fermentoren ble så sterilisert ved oppvarming til 121 °C i 30 minutter under røring. Etter steriliseringen ble fermentoren tilsatt 35 ml 1 % (vekt/vol) tiamin-HCl, 500 ml 10 % kaseinhydrolysat, 100 ml 50 % glukose og 25 ml hver av vitamin- og sporsaltløsningene beskrevet ovenfor. pH i fermentoren ble justert til 5,5 ved tilsetning av 30 % NH₄OH og oppløst O₂ ført til 100 % ved 29 °C. Innholdet i inokulum ble så tilsatt fermentoren og mating startet med tilnærmet 2,0 ml pr. minutt av en matingsløsning som bestod av (a) 3600 ml 50 % glukose; (b) 625 ml av en gjærmatingssaltløsning som inneholdt (pr. liter H₂O): 250 g ammoniumsulfat, 125 g monobasisk kaliumfosfat og 25 g MgSO₄·7 H₂O; (c) 900 ml 50 % EtOH; (d) 60 ml 1 % tiamin-HCl; (e) 450 ml 20 % gjærekstrakt; (f) 450 ml 20 % pepton; (g) 900 ml 20 % kaseinhydrolysat; og (h) 25 ml hver av vitamin- og sporsaltløsningene beskrevet ovenfor. Matingshastigheten ble holdt ved dette nivå i tilnærmet 20 timer og så justert til 3,25 ml pr. minutt i tilnærmet 20 timer, hvorefter kultursupernatanten ble høstet i det vesentlige som beskrevet i eksempel 2 ovenfor.

rhuIL-3 i gjær brygget ble først redusert ved justering til 1 % β-merkaptoetanol ved pH 7,4 fulgt av inkubering i 1 time ved romtemperatur. Den resulterende blanding ble påsatt en 5 cm x 30 cm kolonne pakket med 15-20 μm C-4-revers-fasekisel (Vydac, Separations Group, Hesperia, CA, USA) ved å pumpe det filtrerte gjær brygg direkte på kolonnen. Kolonnen ble ekvilibrert med 0,1 % trifluoreddiksyre i vann (løsemiddel A) før påsetting av gjær brygget, og ble vasket med dette løse-

middel etter avsluttet påsetting av brygget på søylen til den optiske absorbans av det eluerte materiale nærmet seg baselinjeverdier. På dette tidspunkt ble en gradient med 0,1 % trifluoreddiksyre i acetonitril (løsemiddel B) etablert fra 0 % B til 100 % B ved en endringshastighet på 2 % B pr. minutt og en strømningshastighet på 100 ml/minutt.

Toppfraksjoner fra C-4-kolonnen ble slått sammen og justert til 50 mM natriumacetat, pH 4,7. Denne løsning ble så satt direkte på en kolonne med "Mono S"-ionebytterharpiks ekvilibrert med 50 mM natriumacetat, pH 4,7, og rhuIL-3 eluert med en lineær gradient på 1 M natriumklorid over 20 kolonnevolumer. Det resulterende rhuIL-3 var i det vesentlige 100 % Met³rhuIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰) og tilsvarte rhuIL-3-produksjonspartiene beskrevet i eksempel 2 ovenfor med hensyn til biologisk aktivitet.

Eksempel 4

Intravenøs tilførsel av rhuIL-3 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰)-preparater til synomolgusaper

Tre grupper med synomolgusaper (*Macaca fascicularis*), tre hanner og tre hunner i hver gruppe, mottok hver materiale fra en av rhuIL-3-partiene fremstilt som beskrevet i eksempel 2 ved intravenøs tilførsel én gang daglig i 30 på hverandre følgende dager ved dosenivåer på 1 µg/kg (gruppe 2, lavdose), 10 µg/kg (gruppe 3, middels dose) og 100 µg/kg (gruppe 4, høydose). En fjerde gruppe med tre hanner og tre hunner mottok 0,9 % natriumklorid (saltvann) og fungerte som kontrollgruppe (gruppe 1, kontroll). Ett dyr av hvert kjønn fra hver gruppe ble beholdt i en 17 dagers restitusjonsperiode. Kriterier evaluert for virkning av stoffet omfattet overlevelse, kliniske tegn, fysisk, elektrokardiografisk og oftalmoskopisk undersøkelse, forandringer i kroppstemperatur, kroppsvekt, klinisk patologi, organvektmålinger og synlig og mikroskopisk patologi.

Alle dyr overlevde til sitt planlagte avlivningstidspunkt. Behandlingsrelaterte kliniske tegn omfattet anoreksi. Ingen neslekjeder ble påvist. Ikke-behandlingsrelaterte effekter ble bemerket med hensyn til kroppsvekt, fysisk undersøkelse

se, elektrokardiografisk evaluering eller oftalmoskopisk undersøkelse. Klinisk-patologiske parametere som ble vurdert, omfattet hematologi og myeloid/erytroid(M/E)-forhold evaluert fra lårbensutstrykninger. Serumkjemi og urinanalyse ble også utført. Ingen bemerkelsesverdige serumkemiparametere ble observert for middels- og høydoseddyrene ved sammenligning med samtidige kontrollverdier eller respektive verdier forut for behandling. Urinanalyseverdier erholdt under behandlingen var ikke bemerkelsesverdige.

Intravenøs injeksjon av analog-rhuIL-3 gav en dramatisk økning i leukocytallet hos middels- og høydosehanner og -hunner. Det gjennomsnittlige lymfocytall økte også hos cellebehandlede hanner og høydosehunner. Økningen av segmenterte nøytrofiler, eosinofiler og basofiler hos middels- og høydoseddyrene fulgte generelt de økte leukocyt- og lymfocyt-tall. En økning ble også observert i det gjennomsnittlige blodplatetall hos høydosehannene og behandlede hunner i løpet av behandlingstiden. De mest bemerkelsesverdige doserelaterte økninger opptrådte gradvis i løpet av den første og annen uke med en generell nedgang i retning av nivåene før behandling i løpet av restitusjonsfasen.

Undersøkelser av synlig patologi viste abnormaliteter i milt, brissel og binyrer hos dyr som mottok de høyeste doser. Ingen dyr viste imidlertid de samme symptomer, og i ett tilfelle ble abnormaliteten diagnostisert som en forut eksisterende tilstand. En økning av gjennomsnittlig relativ brisselvekt ble bemerket hos lav- og middeldosehanner ved avlivning og hos én lavdose- og én middeldosehunn ved avlivning etter restitusjonsperioden. Mikroskopiske funn bemerket hos dyrene som ble avlivet ved avsluttet tilførsel, var få og hovedsakelig minimale til lette med hensyn til alvorlighetsgrad. Alle histopatologiske funn ble betraktet som tilfeldige og uten opphav i medikamenttilførselen.

Eksempel 5

Klinisk evaluering av IL-3-preparater

rhuIL-3 fra ett eller flere av produksjonspartiene fremstilt som beskrevet i eksempel 2, ble tilført pasienter med fremskredet progressiv neoplasma eller benmargssvikt i

15 dager som daglige, subkutane injeksjoner. Regelmessige, rutinemessige hematologiske og biokjemiske undersøkelser ble utført og benmargsutsugninger og -biopsier erholdt forut for og etter behandlingssyklusen. I alt 14 pasienter ble behandlet
5 med 60, 125, 250 og 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. Ingen pasient avbrøt behandlingen grunnet toksisitet. Hos alle de ni evaluerbare pasienter ble vesentlige økninger i WBC, absolutt segmentert granulocyt-eosinofil- og monocyt-tall så vel som i retikulo-cytt- og blodplatetall observert. De hematologiske endringer,
10 særlig økningen i blodplatetall, opptrådte i det vesentlige i løpet av annen uke med behandling med rhuIL-3 og fortsatte i 1-2 uker etter avsluttet terapi. Den gjennomsnittlige økning i blodplatetall var 179.500/ μl (63.000-448.000). Hos to pasienter med vedvarende trombocytopeni på hhv. 3000/ μl og 22.500/
15 μl økte blodplatetallet til hhv. 104.000/ μl og 88.000/ μl i et lengre tidsrom etter behandling med 60 $\mu\text{g}/\text{m}^2$. Toksiske virkninger omfattet feber hos tre pasienter (annengrads), hodepine hos én pasient (annengrads) og lokal erytem på injeksjonsstedet (førstegrads) hos én pasient. Neslefeber eller mast-
20 celle- eller lymfocytinfiltrasjon i dermis ble ikke observert.

25

30

35

P a t e t k r a v

1. Fremgangsmåte for fremstilling av et rensset rekombinant human-IL-3-analogprotein som omfatter Met³huIL-3
5 (Pro⁸Asp¹⁵Asp⁷⁰),
k a r a k t e r i s e r t v e d a t e n g j æ r v e r t s c e l l e s o m
inneholder en ekspresjonsvektor omfattende en DNA-sekvens som
koder for human-IL-3-analogprotein, dyrkes under betingelser
som fremmer ekspresjon av proteinet.
- 10 2. Fremgangsmåte ifølge krav 1,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t e n g j æ r v e r t s c e l l e a v
arten *Saccharomyces cerevisiae* dyrkes under betingelser som
fremmer ekspresjon av proteinet.
- 15 3. Isolert DNA-sekvens,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n k o d e r f o r e t h u m a n -
IL-3-analogprotein fremstilt ifølge krav 1.
- 20 4. Rekombinant ekspresjonsvektor,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n o m f a t t e r e n D N A -
sekvens ifølge krav 3.
5. Gjørvertscelle,
25 k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n i n n e h o l d e r e n
ekspresjonsvektor ifølge krav 4.
6. Gjørvertscelle ifølge krav 5,
k a r a k t e r i s e r t v e d a t d e n e r a v a r t e n
30 *Saccharomyces cerevisiae*.