



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **327165**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

C12N 15/29 (2006.01)

C07K 14/42 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/14 (2006.01)

C12N 5/16 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

Med flere

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19976058	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1996.06.25 PCT/EP96/02773
(22)	Inng.dag	1997.12.23	(85)	Videreføringsdag	1997.12.23
(24)	Løpedag	1996.06.25	(30)	Prioritet	1995.06.26, EP, 95109949
(41)	Alm.tilgj	1998.02.03			
(45)	Meddelt	2009.05.04			

(73)	Innehaver	Viscum AG, Darmstädter Strasse 34, D-64673 Zwingenberg, DE
(72)	Oppfinner	Hans Lentzen, Rösrath, DE Jürgen Eck, Heppenheim, DE Axel Baur, Meerbusch, DE Holger Zinke, Bickenbach, DE
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vik, 0125 OSLO

(54)	Benevnelse	Rekombinant mistellectin, fremgangsmåte for fremstilling derav, nukleinsyre som koder for dette, vektor, vertscelle samt legemiddel og diagnostisk blanding.
(56)	Anførte publikasjoner	A. G. Tonevitsky et al., Immunology Letters, vol. 46, 1995, s. 5-8 D4) J. B. Dietrich et al., Anti Cancer Drugs, vol. 3, 1992, s. 507-511 DE 4221836, DE 4341476
(57)	Sammendrag	

Nukleinsyremolekyler som koder preproteiner som etter modning oppviser den biologiske aktivitet til mistellectindimeren; vektorer som inneholder disse nukleinsyremolekyler; verter som er transformert med disse vektorer; og polypeptider henholdsvis polypeptiddimerer som kodes av disse nukleinsyremolekyler. De beskrevne polypeptider henholdsvis polypeptiddimerer finner terapeutisk anvendelse på mange områder. Videre beskrives immunotoksiner og legemidler som inneholder de beskrevne polypeptider henholdsvis polypeptiddimerer, også diagnostiske blandinger som inneholder de beskrevne nukleinsyremolekyler, de beskrevne polypeptider henholdsvis polypeptiddimerer og/eller primere som spesifikt hybridiserer på de beskrevne nukleinsyremolekyler. Til slutt beskrives plantebeskyttelsesmidler som inneholder de beskrevne polypeptider og/eller polypeptiddimerer.

Foreliggende oppfinnelse angår nukleinsyremolekyler som koder preproteiner som etter modning oppviser den biologiske aktivitet til mistellectindimeren, vektorer som inneholder disse nukleinsyremolekyler, vektorer som er transformert med disse verter samt polypeptider henholdsvis polypeptiddimerer som er kodet av disse nukleinsyremolekyler. Oppfinnelsens polypeptider henholdsvis polypeptiddimerer er terapeutisk anvendelige på mange områder. Således angår oppfinnelsen videre immunotoksiner samt legemidler som inneholder oppfinnelsens polypeptider henholdsvis polypeptiddimerer. Videre angår oppfinnelsen diagnostiske blandinger som inneholder oppfinnelsens nukleinsyremolekyler, oppfinnelsens polypeptider henholdsvis polypeptiddimerer og/eller primer som spesifikt hybridiserer til oppfinnelsens nukleinsyremolekyler.

Mistelekstrakter har i århundrer vært benyttet terapeutisk. Siden begynnelsen av dette århundre er mistelpreparater anvendt ved kreftterapi med varierende hell (Bocci, 1993; Gabius et al., 1993; Gabius & Gabius, 1994; Ganguly & Das, 1994]. Hajto et al. [1989, 1990] kunne vise at de terapeutiske virkninger særlig kunne tilskrives såkalte mistellectiner (Viscumin, Viscum-album-agglutinin, VAA). I dag diskuteres ved siden av en cytotoxisk virkning særlig en (ikke-spesifikk) immunostimulering hvis positive effekt utnyttes for ledsagende terapi og for etterpleie av tumorpasienter. En økning av livskvaliteten hos slike pasienter formidles muligens ved uttømming av kroppsegne endorfiner (Heiny og Beuth, 1994).

Tallrike undersøkelser in vitro (Hajto et al., 1990; Männel et al., 1991; Beuth et al., 1993) og in vivo (Hajto, 1986; Hajto et al., 1989, Beuth et al., 1991; Beuth et al., 1992) samt kliniske studier (Beuth et al., 1992) bekrefter den økede frisettning av inflammatoriske cytokiner (TNF- α , IL-1, IL-6) samt en aktivering av cellulære komponenter i immunsystemet (T_H-celler, NK-celler).

DE 4341476 beskriver et middel som fortrinnsvis inneholder B-kjeden til ML-I, ML-II eller ML-III. Middelet er tenkt anvendt til undersøkelser og påvirkning av cellulære endringer på lectinbasis i forbindelse med diagnose og behandling av sykdom.

DE 4221836 beskriver et immunmodulatorisk stoff, ML-I, ekstrahert fra mistel som tilhører en gruppe av galaktosidspesifikke lectiner. ML-I består av en toksisk A-kjede og en sukkerbindende B-kjede. Den N-terminale aminosyresekvensen til A₁ og A₂ og B-kjeden er vist. ML-I er en dimer bundet sammen av en disulfidbro.

A.G. Tonevitsky et al., Immunology Letters, vol. 46, 1995, s. 5-8 omhandler mistenlectin I fra *Viscum album* som et glykoprotein med en MW på 563 kDa. Proteinet består av en A-kjede og en B-kjede som er bundet sammen av en disulfidbro.

- 5 J.B. Dietrich et al., Anti Cancer Drugs, vol. 3, 1992, s. 507-511 angir at mistel inneholder tre toksiske lectiner, ML-I, ML-II og ML-III. Virkningsmekanismen for den toksiske effekten av ML-I er identisk med mange andre plantetoksiner, bl.a. ricin. Lectinet bindes først via B-kjeden til celleoverflaten ved hjelp av interaksjon med sukker. Deretter skjer en endocytose av lectinet inn i cellen etterfulgt av enzymatisk
10 inhibering av ribosomer satt i gang av A-kjeden.

Som aktiv bestanddel i mistelekstrakter ansees i dag et 60 kDa mistellelectinprotein som på biologisk måte kan oppnås fra ekstrakter (Franz et al., 1977; Gabius et al., 1992). ML-proteinet består av to kovalent S-S-broslåtte underenheter, hvis A-kjede er ansvarlig
15 for en enzymatisk inaktivering av ribosomer (Endo et al., 1988) og hvis B-kjede er ansvarlig for karbohydratbindingen. Den biologiske aktivitet tilbakeføres, i alle fall så langt man i dag vet, hovedsakelig til lectin-aktiviteten av B-kjeden (Hajto et al., 1990).

Kunnskapen om struktur-virkningssammenhengen for mistellelectin (ML) er dog liten til i
20 dag. Sålde er bidraget til de enkelte kjeder og deres forskjellige biokjemiske og enzymatiske aktivitet med henblikk på den observerte, virkning henholdsvis den terapeutiske effekt, uklar. Analysen av struktur-virkningssammenhengen vanskeliggjøres ved kontaminering av preparatene med andre plantebestanddeler fra mistel (Stein & Berg, 1994). Det diskuteres en avhengighet av aktiviteten av ekstraktpreparatet av
25 forskjellige sammensetninger av ekstrakten, i sin tur avhengig av typen vertstre (for eksempel eple, furu, poppel) (Hülsem et al., 1986). Både for viskotoksiner (Garcia-Olmedo et al., 1983; Mendez et al., 1990) og for ytterligere viscuminer (for eksempel ML-2, ML-3) postuleres det tilsvarende virkninger (Eifler et al., 1994). Selv ML-preparater som er renset til høyren kvalitet på biokjemisk måte (affinitetskromatografi)
30 oppviser en betydelig heterogenitet (figur 8). Strukturvarianter diskuteres for glykosyleringen av ML A- og B-kjedene samt for sekvensvariasjoner. Gabius et al. (1992) og Dietrich et al. (1992) viser en sekvensvariabilitet for A1- og A2-kjedene av ML-1.

- 35 For på nøyaktigere måte å kunne undersøke de terapeutiske virkninger av mistellelectin er en renfremstilling som strukturelt homogen substans, ønskelig. Videre er det for fag-verdenen av interesse å kunne fremstille mistellelectin eller dennes bestanddel i store

mengder og i ren form for å kunne utnytte den/de i stor teknisk målestokk som aktiv bestanddel i legemidler. Det har til i dag ikke vært mulig å realisere dette ved hjelp av de i den kjente teknikk foreliggende metoder. Ved isolering fra plantematerialet oppnås det etter dagens teknikk alltid en heterogen substansblanding. Heterogenitetene til
 5 plantemistellecตินpreparater skyldes blant annet den posttranslasjonelle prosessering av ML-1 til isoformene ML-2 og ML-3 slik at mistellecтинpreparater, avhengig av isoleringsmetodikken eller fermenteringsvarigheten, oppviser et varierende innhold av ML-1, ML-2 og ML-3 (Jäggy et al., 1995). Hver av de nevnte isoformer oppviser i tillegg også en langtgående mikroheterogenitet som er vist i figur 8 med ML-1 ved
 10 isoelektrisk kromatofokusering.

Oppgave for foreliggende oppfinnelse var derved å tilveiebringe mistellecтин i ren form og i mengder som tillater en stor teknisk utnyttelse. Denne oppgave løses ved de i kravene gitte utførelsesformer.

15

Derved angår oppfinnelsen et nukleinsyremolekyl som

- (a) koder et preproprotein som etter modning oppviser den biologiske funksjon til mistellecтинindimeren og oppviser den i figur 4c viste nukleinsyresekvens;
- (b) koder et fragment av preproproteinet ifølge (a), hvorved fragmentet naturlig er en
 20 biologisk aktiv bestanddel av mistellecтинindimeren;
- (c) skiller seg fra nukleinsyremolekylet ifølge (a) eller (b) ved degenerering av den genetiske kode; eller
- (d) hybridiserer under stringente betingelser med nukleinsyremolekylet ifølge (a), (b) eller (c) og koder et polypeptid med den under (a) eller (b) angitte, biologiske
 25 funksjon.

I fremstillingen av gensekvensene til mistellecтин kan man nå for første gang, ut fra denne sekvens, oppnå rekombinante, høyrene enkeltkjeder (rMLA, rMLB) som kan reassosieres in vitro og derved gir et rML-holoprotein som er proteinkjemisk,
 30 enzymatisk og strukturelt homogent. Det reassosierte, rekombinante protein oppviser ingen variabilitet og mikroheterogenitet, særlig med henblikk på primærstrukturen og den posttranslasjonelle modifikasjon (glykosyleringen, fosforyleringen) og er særlig egnet både som holoprotein, som delkjede og i form av subfragmenter for terapeutiske formål.

35

Med "fragment" av et mistellecтинpreprotein menes ifølge oppfinnelsen ethvert fragment, altså ikke kun et naturlig forekommende fragment, som er en biologisk aktiv

bestanddel av mistellectindimeren. For tydeliggjøringens skyld henvises det til at fagmannen med en slik biologisk aktiv bestanddel av mistellectindimeren selvfølgelig også mener slike bestanddeler som er bestanddeler av de enkelte kjeder av dimeren. Derved er selvfølgelig også enkelte kjeder eller fragmenter derav, som er bestanddel av den i figur 4c viste sekvens, aktuelle i forbindelse med oppfinnelsen. Begrepet "naturlig" eller lignende i forbindelse med "bestanddel av mistellectin" betyr i forbindelse med oppfinnelsen at det på denne måte kjennetegnet fragment enten utgjør en kjede av mistellectindimeren eller er et subfragment av kjeden som på naturlig måte forekommer i kjeden. Dette fragment er fortrinnsvis biologisk aktivt.

Med "biologisk aktivt" menes ifølge oppfinnelsen at disse fragmenter oppviser minst en biologisk funksjon for kjeden eller dimeren som her beskrevet eller en annen biologisk funksjon for de enkelte kjeder eller dimeren. I tillegg menes med "biologisk aktiv" også en farmakologisk og/eller immunologisk aktivitet.

Ved hjelp av rekombinante ML-proteiner er det i tillegg for første gang mulig med en undersøkelse av bidragene for de enkelte domener og subdomener på eksperimentell måte. Rekombinante ML-proteiner og rekombinante underenheter/delkjeder er grunnlaget for tilsvarende definerte monosubstanspreparater som erstatning for ekstrakt-preparater og standardiserte ekstrakter.

Kloningen av genet som koder mistellectin kunne gjennomføres på overraskende måte basert på en ny kloningsstrategi etter at konvensjonelle kloningsstrategier hadde sviktet:

Av mistellectin ML-1 er det kjent en rekke proteinkjemiske data. Disse er ved siden av molekylvekt og underenhetsstruktur, særlig korte N-terminale peptider, hvis aminosyre-sekvenser uavhengig er beskrevet av Dietrich et al. (1992) og Gabius et al. (1992) (se også DE 4221836). Fra de N-terminale peptider av A- henholdsvis B-kjeden er det på grunn av aminosyresammensetningen og den dermed forbundne høye degenerasjonsgrad i de avledbare nukleinsyresekvenser praktisk talt umulig å fremstille syntetiske oligonukleotider hvis degenerasjonsgrad er tilstrekkelig lav til å kunne muliggjøre identifisering av ML-genfragmenter ved screening av genomiske genbiblioteker. Dette gjelder likeledes for cDNA-genbanker som er fremstilt ut fra *Viscum album* poly-(A⁺)-RNA.

Polymerasekjedereaksjonen tillater en amplifikasjon av DNA-avsnittene som ligger mellom kjente avsnitt (Erlich et al., 1988). Med et "sens"-oligonukleotid kunne man, ved å gå ut fra N-terminus av MLA og en "antisens"-oligonukleotid N-terminal av

MLB, tenke seg en amplifikasjon av det mellomliggende genavsnitt under forutsetning av at ML-genet var intronfritt (figur 1a). I praksis viser en analyse av den N-terminale sekvens av B-kjeden, at degenerasjonsgraden for de tenkelige kombinasjoner av oligonukleotider er altfor høy til en vellykket gjennomføring av denne tanke. Dette skyldes særlig den for en oligonukleotidkonstruksjon ugunstige sekvens av B-kjede N-terminus, hvorved en amplifikasjon av ML-gensekvensene i praksis ikke kan gjennomføres ved å gå ut fra de kjente aminosyresekvensområder (figur 1b).

For kloning av ML-genet ved hjelp av en endret PCR-strategi ble det derfor forsøkt, for konstruksjon av amplifikasjonsoligonukleotider, å hente inn ytterligere proteindata, særlig på basis av slektskapsforbindelser mellom mistellectin og klassen av type I- og type II-ribosom-inaktiverende proteiner (RIPs) (Stirpe et al., 1992). Basert på multipl oppstilling/sammenligning

(a) type I-RIP-proteiner og ricin-A-kjeder samt

(b) b-kjedene av abrin og ricin,

ble det identifisert konserverte regioner på til sammen 8 sekvensområder. Ut fra disse sekvensregioner og under med anvendelse av kodonutnyttningstabeller til beslektede specier, ble det konstruert til sammen 21 oligonukleotider som ble anvendt i forskjellige kombinasjoner i mer enn 200 amplifikasjonsforsøk. Ikke i noe tilfelle kunne det dog oppnås spesifikke amplifikasjonsprodukter selv om PCR-betingelsene hva angår annealing-temperatur, Mg^{2+} -innhold samt cyklusparametere, ble variert innen vide grenser.

Hverken screening av genomiske eller cDNA-banker og heller ikke anvendelsen av PCR-teknikker, muliggjorde derved å komme frem til spesifikke ML-DNA-sekvenser på grunn av de anførte teorier.

Det ble derfor lett etter nye veier for å kunne innføre ytterligere strukturelle egenskaper av ricin- og abrinstrukturen i konstruksjonsarbeidet ved amplifikasjonsnukleotidene.

30

Da den enzymatiske mekanisme av ribosom-inaktiverende proteiner, RIPs, særlig her type II-RIP-ricin, er lik ML (Endo et al., 1988a + 1988b), kunne man ikke utelukke at det også skulle kunne være til stede strukturelle overensstemmelser på nivå med de funksjonelle primær- og tertiærstrukturområder. Ut fra krystallstrukturen til ricin (Katzin et al., 1991; Rutenber & Robertus, 1991; Weston et al., 1994) ga en analyse av kjedefleksibiliteten i ricin-A-kjeden en antydning til den lave mobilitet for Arg180 som ligger innenfor et konservert sekvensområde. I tillegg ble det gjennomført en analyse av

35

den på grunn av den steriske anordning av kjederyggraden gitte, mulige aminosyresubstitusjon i dette området av det aktive sentrum under hensyntagen til substratvekselvirkningen. Resultatet av disse teorier ble så satt i forbindelse med en vurdering av omfattende sekvens-oppstillinger for ricin-A-kjeden og ytterligere type I-RIPs.

Med utvidelsen av resultatene av sekvenssammenligningene med medianvendelse av strukturelle data oppnådde man så sannsynlighetsdata for opptreden av spesielle aminosyrerester på spesielle posisjoner. Derved ble det mulig å postulere en rekke teoretiske ML-aminosyresekvenser for dette området og så ved hjelp av disse, å konstruere et tilsvarende, uvanlig lite degenerert oligonukleotid (RMLA2) (figur 1c).

Med kombinasjonen RMLA1 (et degenerert oligonukleotid, som ble avledet fra den N-terminale aminosyresekvens av MLA-kjeden; se figur 1b) og det ved den ovenfor angitte teori konstruerte "active-site"-oligonukleotid RMLA2 kunne man så, ved definerte PCR-parametere og ved å gå ut fra komplekse ML-DNA, oppnå fragmenter etter at alle alternative forsøk i denne retning var resultatløse som beskrevet ovenfor.

Fullstendigjøgningen av sekvensinformasjonen for genet ble nå gjennomført via spesifikke, ikke-degenererte oligonukleotidprimere, avledet fra den med kloning og sekvensering av fragmentet a (figur 3) tilstedeværende gendelsekvens av MLA, og degenererte oligonukleotider, avledet fra RIP I og ricin/abrin-sekvensoppstillinger, ved hjelp av ytterligere PCR-amplifikasjoner. For konstruksjon av de degenererte B-kjede-oligonukleotider ble det anvendt sekvensoppstilling av B-kjedene av ricin og abrin, der det likeledes ble funnet enkelte områder med høy konservering.

For fremstilling av 5'- og 3'-endene av holoproteinet, B-kjede-delfragmenter samt de 5'- og 3'-ikke-translaterende avsnitt syntetiserte man fra isolerte mistel-RNA analog cDNA ved reverstranskripsjon og ved hjelp av RACE-teknikken (Frohman et al., 1988) de tilsvarende genavsnitt. etter at et antall hver gang overlappende genfragmenter var til stede (figur 3) fremstilte man til slutt fullstendige A-kjede- og B-kjedegenavsnitt, hele tiden ved å gå ut fra kompleks genomisk mistel-DNA, nok en gang ved spesifikk PCR. Gensekvensene av rMLA og rMLB, utstyrt med terminale modifikasjoner, er vist i figur 4a og figur 4b. De også 5'- og 3'-ikke-translaterende områder samt endopeptid- og signalpeptidkodende genavsnitt omfattende fullstendig ML-gensekvens, er vist i figur 4c.

I en foretrukket utførelsesform av oppfinnelsens nukleinsyremolekyl er fragmentet A-kjeden av mistellectinet som kodes ved den i figur 4a (MLA) viste nukleotidsekvens.

5 I en ytterligere foretrukken utførelsesform av oppfinnelsens nukleinsyremolekyl er fragmentet B-kjeden av mistellectinet som kodes av den i figur 4b (MLB) viste nukleotidsekvens.

En ytterligere foretrukken utførelsesform av oppfinnelsen er et nukleinsyremolekyl som er et DNA-molekyl.

10

Innenfor oppfinnelsens ramme menes med "DNA-molekyl" både et genomisk og et cDNA-molekyl eller et (semi)syntetisk DNA-molekyl. Fremgangsmåter for fremstilling av disse forskjellige DNA-molekyler er kjent for fagmannen på dette området.

15 I en ytterligere foretrukken utførelsesform av oppfinnelsen er nukleinsyremolekylet et RNA-molekyl.

Oppfinnelsen angår videre en vektor som inneholder minst et nukleinsyremolekyl ifølge oppfinnelsen.

20

Oppfinnelsens vektor kan for eksempel inneholde et eneste nukleinsyremolekyl ifølge oppfinnelsen som koder det totale mistellectinpreproteinet. I den grad denne vektor er en ekspresjonsvektor, kan preproteinet prosesseres i en egnet, transformert vert og de monomere enheter kan føyes sammen til mistellectindimer in vivo eller in vitro. I en
25 annen utførelsesform er oppfinnelsens vektor en vektor som kun anvendes for propagering av oppfinnelsens nukleinsyre.

I en foretrukken utførelsesform inneholder oppfinnelsens vektor både et nukleinsyremolekyl som koder A-kjeden av mistellectinet eller et fragment derav, eller også et
30 nukleinsyremolekyl som koder B-kjeden eller et fragment derav. Fortrinnsvis er fragmentene av monomeren biologisk aktive.

I en ytterligere foretrukken utførelsesform er oppfinnelsens vektor en ekspresjonsvektor. Fagmannen vet hvordan egnede ekspresjonsvektorer skal tilveiebringes for forskjellige
35 vertsorganismer.

I forbindelse med oppfinnelsen kan det for heterolog ekspresjon bli fremstilt en sekvens som koder for mistellectin A-kjeden ved spesifikk PCR ved å gå ut fra kompleks, genomisk mistel-DNA. Via ikke-komplementære områder av de anvendte primer-oligonukleotider føyes det så til translasjonskontrollelementer samt erkjennelses-
 5 sekvenser som restriksjons-endonukleaser, hvorved det ved å gå ut fra de genomisk foreliggende prepromistellectin-gen er mulig med kloning og separat ekspresjon av mistellectin A-kjeden.

5'-området av den for rMLA-kodende sekvens tilsvarende aminosyrerestene tyrosin¹ -
 10 tyrosin¹⁷ (Dietrich et al., 1992; Gabius et al., 1992) ble fremstilt under forkobling av et translasjons-startkodon som syntetisk genfragment ved hybridisering og kloning av to oligonukleotider. Herved oppnådde man en optimering av gensekvensen med henblikk på kodonutvalget slik det er beskrevet for sterkt eksprimerte gener i *Escherichia coli* (Gribskov et al., 1984). Ved 3'-enden av det syntetiske rMLA-genfragment samt ved 5'-
 15 enden av det ved hjelp av PCR-fremstilte rMLA-genfragment ble det ved målrettet utveksling av tyrosin¹⁷-kodonet fra TAC til TAT innført et Ssp I-restriksjonskuttese som muliggjorde en fusjon av de to rMLA-genfragmenter under fremstilling av vektoren pML14-17 (figur 5). Den for rMLA-kodende sekvens ble bekreftet ved DNA-sekvensering (figur 4a). For ekspresjon av rMLA i *Escherichia coli* ble gensekvensen isolert fra
 20 vektoren pML14-17 og ved innskyting i ekspresjonsvektoren pT7-7 (Studier & Moffart, 1986) satt under kontroll av T7-RNA-polymerasepromotoren samt en transkripsjons-terminal. Med den resulterende ekspresjonsvektor pT7-MLA (figur 5) ble *E. coli*-ekspresjonsstammen BL21 transformert. Induksjonen av genekspresjonen kjennetegnes ved opptreden av et proteinbånd tilsvarende den ikke-glykosylerte, rekombinante
 25 mistellectin A-kjede som har en relativ molekylmasse på 25 kDa. Påvisning og identifisering av det rekombinante ekspresjonsprodukt skjedde ved Western-blott-analyse under anvendelse av et spesifikt anti-MLA-antistoff (figur 7).

For heterolog ekspresjon av mistellectin B-kjeden ble den fullstendige, MLB-kodende
 30 sekvens amplifisert ved spesifikk PCR fra kompleks, genomisk *Viscum album* DNA hvorved de anvendte primeroligonukleotide translasjonskontrollelementer samt erkjenningssekvenser for restriksjonsendonukleaser kan innføres via ikke-komplementære områder (figur 6). Det resulterende 0,8 kbp PCR-produkt ble etter kloning i TA-kloningsvektoren pCRII satt under kontroll av transkripsjonskontrollelementer ved
 35 innskyting i ekspresjonsvektoren pT7-7 og transformert med den resulterende ekspresjonsvektor pT7-MLB av ekspresjonsstammen *E. coli* BL21.

Integriteten av den rMLB-kodende sekvens ble bekreftet ved DNA-sekvensering (figur 4b). Påvisning av ekspresjonen skjedde ved Western-blott-analyse under anvendelse av et spesifikt anti-MLB-antistoff (TB33, Tonevitsky et al., 1995), hvorved et immunreaktivt protein med en relativ molekylmasse på 31 kDa tilsvarende den ikke-glykosylerte, rekombinante mistellectin-B-kjede opptrådte 2 timer etter induksjon av genekspresjonen (figur 7b). En analyse av cellefraksjonen etter total celleoppslutning av *E. coli*-cellene viste en oppdeling av den syntetiserte rMLB-kjede i en oppløselig andel i supernatanten samt en uoppløselig "inclusion bodies"-andel i sedimentet av *E. coli*-celleoppslutningsresten, hvorved den oppløselige henholdsvis uoppløselige andel begge utgjorde 50% av det totale utbyttet 4 timer etter induksjonen (figur 7b).

Videre angår oppfinnelsen, i henhold til krav 9, en vert som er transformert med minst en vektor ifølge oppfinnelsen.

Alt etter fagmannens målsetning kan man med oppfinnelsens vert fremstille kun en av de to monomerer eller kombinasjonen av begge monomerer, fortrinnsvis som assosiert dimer. Oppfinnelsens vert kan være en eukaryotisk eller prokaryotisk celle, en transgenisk plante eller et transgenisk dyr. Fortrinnsvis er oppfinnelsens vert en pattedyrce, en plantecelle, en bakterie, en soppcelle, en gjærce, en insektscelle eller en transgenisk plante.

I en spesielt foretrukken utførelsesform er oppfinnelsens vert bakterien *E. coli*, en *Aspergillus*-celle eller en *Spodoptera*-celle, fortrinnsvis en *Spodoptera frugiperda*-celle.

Oppfinnelsen angår videre, som angitt i krav 13, et polypeptid som kodes av oppfinnelsens nukleinsyremolekyl eller oppfinnelsens vektor og/eller produseres av oppfinnelsens vert.

Oppfinnelsens polypeptid oppviser fortrinnsvis den biologiske aktivitet til A-kjeden eller B-kjeden av mistellectin. I andre utførelsesformer kan oppfinnelsens polypeptid dog kun oppvise en del av den biologiske aktivitet eller over hodet ingen biologisk aktivitet. Med "del av den biologiske aktivitet" menes innenfor oppfinnelsens kontekst enten en redusert aktivitet og/eller et antall av aktiviteter fra det biologiske aktivitetsspektrum. Oppfinnelsen polypeptid kan også være et fragment av A- eller B-kjeden som oppviser en av de ovenfor angitte egenskaper.

Undersøkelser av egenskapene av rMLA, rMLB og rML-holoprotein.

(I) Relativ molekylmasse og struktur

De relative molekylmasser ble bestemt ved SDS-polyakrylamidgel-elektroforese under
5 reduserende betingelser og etterfølgende proteinfarving ved hjelp av sølv- henholdsvis
coomasssi-brilliant-blå henholdsvis ved immunologisk farving innenfor rammen av en
Western-blott-analyse.

Overraskende ble det herved funnet at den rekombinante, ikke-glykosylerte mistellectin-
10 A-kjede oppviste en relativ molekylmasse på 25 kDa og derved skilte seg signifikant fra
den naturlige mistellectin-A-kjede A₁ med 31 kDa henholdsvis A₂ med 29 kDa. Denne
forskjell i relativ molekylvekt er overraskende fremfor alt fordi man innen den kjente
teknikk har gått ut fra at A-kjeden ikke er glykosylert. Den rekombinante mistellectin-B-
kjede oppviser en relativ molekylmasse på 31 kDa og er derved vesentlig lettere enn den
15 glykosylerte, naturlige mistellectin-B-kjede med 36 kDa (figur 7).

Den ved naturlige ML-proteiner opptredende heterogenitet på grunn av glykosylering
og/eller sekvensvariasjoner og som viser seg i SDS-gel som bredt bånd, inntreffer når det
gjelder rekombinante specier, ikke i noen av de undersøkte tilfeller.

20

De relative molmasser av de reassosierte rMLA/rMLB-holoproteiner (rML) kommer i
tillegg til 56 kDa sammenlignet med den tyngre nML med 65-67 kDa.

(II) Isoelektrisk homogenitet

25

rMLA viser seg som et isoelektrisk homogent protein med et isoelektrisk punkt på 6,8 i
motsetning til høyrene, naturlige mistellectin-A-kjeder som deler seg opp i 4 specier
med isoelektriske punkter på 5,2; 5,4; 5,7 og 6,2 (figur 8).

30 rMLB viser seg som et isoelektrisk homogent protein med et isoelektrisk punkt på 5,1 i
motsetning til naturlig mistellectin-B-kjede som deles opp i minst 2 specier med iso-
elektriske punkter på 7,1 og 7,3 (figur 8).

For det naturlige ML-holoprotein gir det seg derved et antall molekylvarianter og
35 -kombinasjoner (figur 8 nederst), mens det for rekombinante mistellectinproteiner gir
seg en enhetlig mobilitet ved IEF-kromatofokusering, noe som dokumenterer
homogeniteten for rML i forhold til mikroheterogeniteten til de naturlige proteinspecier.

(III) Enzymatisk aktivitet av rMLA

Ved anvendelse av immunoaffinitetsrensede rMLA-preparater i en koblet transkripsjons/translasjonsanalyse påviste man den translasjonsinhiberende aktivitet for rMLA (isolert fra oppløselige ekspresjonsproduktandel) og rMLA (isolert fra uoppløselige "inclusion-bodies"-andeler).

rMLA viser, sammenlignet med naturlig mistellectin-A-kjede, en annen hemmekarakteristikk med henblikk på doseringsavhengigheten av translasjonsinhiberingen samt med henblikk på den ikke-inhiberende translasjons-restaktivitet i anvendte retikulocyt-lysater, sh. (figur 9). Den enzymatiske egenskap som utgjør grunnlaget for den toksiske virkning av ML-holoproteiner, er redusert signifikant i rekombinante specier.

(IV) Karbohydrat-bindende aktivitet av rMLB

rMLB-kjeder som er fremstilt fra de primære ekspresjonsprodukter ved renaturering og reoksydasjon samt også de in vitro reassosierte rMLA/rMLB-, rMLA/MLB- og MLA/rMLB-holoproteiner, viser karbohydrat-bindende aktivitet som kan påvises ved "Enzyme-Linked-Lektin-Assay" (ELLA) ved binding til Carbohydrat-Matrices Asialofetuin eller Fetuin. Karbohydrat-spesifisiteten for den rekombinante rMLB-kjede kan bestemmes i ELLA-systemet under kompetitive betingelser for galaktose, β -laktose, N-acetyl-galaktosamin (GalNAc) og sialinsyre (N-acetyl-neuraminsyre, NANA) og kvantifiseres. Den kompetitive ELLA viser herved overraskende varierende karbohydrat-spesifisiteter for nMLB og rMLB. Bindingsaffiniteten ble herved beskrevet ved de systemspesifikke IC_{50} -verdier for den halvmaksimale fortrenghing av proteinene av immobilisert asialofetuin-ligand på grunn av galaktose (IC_{50} nMLB: 4,5 mM; IC_{50} rMLB: ikke bestemmbar på grunn av for lav vekselvirkning), β -laktose (IC_{50} nMLB: 4,9 mM; IC_{50} rMLB > 70 mM), N-acetyl-galaktosamin (IC_{50} nMLB: 20,7 mM; IC_{50} rMLB: 109 mM) eller immobilisert fetuin-ligand på grunn av sialinsyre (IC_{50} nMLB: 49,8 mM; IC_{50} rMLB: 47,1 mM).

Mens den som galaktose-spesifikk lectin beskrevne nMLB-kjede som ventet kan konkurrere med galaktose og β -laktose viser rekombinant i E. coli-fremstilte rMLB-kjede ingen påvirkbar vekselvirkning med galaktose og en liten vekselvirkning med β -laktose. Rekombinant rMLB har derfor en tydelig affinitet til N-acetyl-galaktosamin

og sialinsyre og viser derved, sammenlignet med vegetabilsk nMLB, meget overraskende en tydelig forskyvning av karbohydratspesifisiteten mot et N-acetyl-galaktosamin/sialinsyre-spesifikt lectin. Med henblikk på den biologiske aktivitet av rMLB- og rMLB-holdige holoproteiner gir det seg her en mulighet for en sammenlignet med vegetabilsk mistellectinprotein utvidet eller forskjellig ligand-, reseptor- eller målcelle-spektrum.

I en foretrukken utførelsesform oppviser oppfinnelsens polypeptid minst en kjemisk eller enzymatisk modifisering.

Denne modifisering kan endre, redusere eller øke eventuelt tilstedeværende, biologisk aktivitet. En slik modifisering kan for eksempel skje etter translasjon og isolering av polypeptidet. På den annen side kan slike modifikasjoner føyes inn ved den kjemiske eller semisyntetiske fremstilling av oppfinnelsens polypeptid. Disse modifikasjoner kan føyes inn av fagmannen i henhold til i og for seg kjente metoder for å forandre, fortrinnsvis å forbedre, den farmakologiske aktiviteten hos mistellectin.

I en ytterligere, foretrukken utførelsesform er oppfinnelsens polypeptid et fusjonsprotein. Fusjonsproteinet oppviser fortrinnsvis den ovenfor definerte, biologiske aktivitet.

Også disse utførelsesformer av oppfinnelsens polypeptid er fortrinnsvis rettet mot å endre og fortrinnsvis å forbedre de farmakologiske egenskaper hos mistellectinpolypeptidet for ytterligere mål på det cellulære plan.

Oppfinnelsen angår videre, i henhold til krav 16, en polypeptiddimer med de biologiske aktiviteter hos mistellectin, hvorved de to monomerer kodes av oppfinnelsens nukleinsyremolekyler.

Med "mistellectins biologiske aktivitet" menes enhver biologisk aktivitet fra spekteret til de totale, biologiske aktiviteter hos mistellectin. En slik funksjon er for eksempel den farmakologiske virkning av mistellectin.

I tallrike humane og murine tumorcellelinjer induerte vegetabilsk mistellectin-1 celledød ved apoptotiske mekanismer (Janssen, 1993). Mistellectin-1 henholdsvis B-kjeden alene induerte frisetting av cytokiner fra perifere, mononukleære celler av sunne, humane blodgivere (Hajto, 1990). Fra neutrofile granulocytter fra kreftpasienter

- induserte mistellectin-1 sekresjon av peroksydanioner (Timoshenko, 1993). Mistellectin-1 induserte ekspresjon av A-kjeden av interleukin-2-reseptoren (CD25) henholdsvis HLA-DQ-antigenet på perifere lymfocytter av sunne, humane blodgivere (Beuth, 1992). etter applikasjon av mistellectin-1 i mus målte man en økning av thymus-
 5 celletallet, antallet av cytotoksiske T-lymfocytter (Lyt-2+) og hjelper-T-celler (L3T4+) i thymus og antallet peritonealmakrofager, også særlig de som bar aktiveringsmarkøren MAC-3 (Beuth, 1994). Også forholdet L3T4+:Lyt2+ i thymus hos forsøksdyrene ble forhøyet. I periferiblod fra mus ble densiteten av leukocytter, lymfocytter, monocytter generelt og spesielt lymfocytene, som uttrykker interleukin-2-reseptoren som
 10 aktiveringsmarkør på celleoverflaten, samt monocytter som uttrykker aktiveringsmarkøren MAC-3, øket etter behandling med mistellectin-1 (Beuth, 1994). I blod hos kreftpasienter øker mistellectin-1 densiteten av T-lymfocytter (CD4+, CD8+), de naturlige dreperceller og B-lymfocytter (Beuth, 1992).
- 15 Videre ble det påvist en økning av det endogene opiatmediator β -endorfin i blodplasma hos mammakarsinompasienter etter applikasjon av mistellectin-1 (Heiny, 1994). I tillegg ble det påvist at mistellectin-1 øket den cytotoksiske virkning av perifere, naturlige dreperceller i forhold til K-562-tumorceller, og øket densiteten av store, granulære lymfocytter (LGL) i periferiblod (Hajto, 1989). En anti-metastatisk aktivitet av
 20 mistellectin-1 på sarkomceller i mus er bekreftet (Beuth, 1991).

I en ytterligere utførelsesform oppviser oppfinnelsens polypeptiddimer det samme spektrum av biologiske aktiviteter som den naturlige mistellectindimer.

25 (V) Biologiske aktiviteter av rekombinante mistellectin

- Fremstillingen av rML-holoproteiner under anvendelse av separat rekombinant syntetiserte enkeltkjeder skjedde ved å gå ut fra foldede, oppløselige kjeder eller ved å gå ut fra denaturerte rMLA- og rMLB-kjeder innenfor rammen av en kofolding, hvorved
 30 fortrinnsvis rMLB ble reassosiert in vitro med et molart overskudd av rMLA i nærvær av et glutation-redoks-system og særlig i nærvær av protein-disulfid-isomerase. rML-holoproteinet som tilsvarte heterodimeren ble isolert og rensset ved separering av fri rMLA og rMLA-dimerer ved affinitetskromatografi på N-acetyl-galaktosamin-agarose eller laktosyl-agarose fra reassosiasjonssatsen. På analog måte ble rMLA/rMLB (rML)
 35 og rMLA/nMLB-heterodimere-holoproteiner fremstilt.

Cytotoksisk aktivitet

Den cytotoksiske virkning som eksempel på en biologisk aktivitet for reassosierte holoproteiner ble prøvet på en human monocytteleukemicellelinje (MOLT4). Både B-kjeden (overflatebinding) og A-kjeden (enzymatisk ribosom-inaktivering) ytet bidrag til den observerte, cytotoksiske effekt. Et in vitro reassosiert rMLA/rMLB-holoprotein samt et in vitro reassosiert rMLA/mMLB-holoprotein ble sammenlignet med to charger av naturlig nML-holoprotein. De rekombinante rMLA/rMLB- og rMLA/nMLB-holoproteiner oppviste sammenlignbare, høyt cytotoksiske egenskaper med IC₅₀-verdier rundt 10-30 pg/ml (figur 11), noe som dokumenterer den funksjonelle integritet og biologiske aktivitet for de under anvendelse av rekombinante kjeder in vitro reassosierte rML-holoproteiner. For å utøve den cytotoksiske aktivitet er herved den funksjonelle sammenknytting av B-kjeden med en enzymatisk aktiv A-kjede, nødvendig, da den isolerte rMLB-kjede ganske overraskende ikke viste noen cytotoksisk aktivitet alene. En enn så lenge diskutert cytotoksisk aktivitet for vegetabilsk mistellectin-B-kjedepreparater er i henhold til dette er høyst sannsynlig å føre tilbake til et restinnhold av nML-holoprotein. Med den rekombinante fremstilling av enkeltkjedene har man derved for første gang muligheten til separat beskrivelse og anvendelse av karbohydratbindende og enzymatisk aktivitet hos mistellectin.

Induksjon av apoptose

Evnen til induksjon av apoptose som eksempel på en biologisk aktivitet hos mistellectin ble påvist for rekombinant rML-holoprotein på den monocytære cellelinje U937. Ved behandling av cellene med 70 pg/ml kunne man herved, etter 24 timer, påvise induksjon av apoptose ved rML-holoprotein (figur 12). Ved undersøkelser med mistellectin på MOLT-4-celler og perifere-blod-mononukleære celler (PBMC) kunne det påvises at i lavdoseområdet utgjorde induksjonen av apoptotiske prosesser grunnlaget for den cytotoksiske aktivitet hos mistellectin. Da cytokin-induksjonen skjer i konsentrasjonsområdet mellom lavere cytotoxisitet (figur 13, figur 14) er en korrelasjon med den apoptose-induserte aktivitet, plausibel. Derimot overdekkes apoptosen ved nekrotiske effekter i høydosisområdet samt ved lengere inkubasjonstider. En cytotoxisitet som følge av apoptosen kunne ikke fastslås ved behandling av de sensitive MOLT-4-celler med rekombinant B-kjede slik at den biologiske aktivitet i forbindelse med apoptose-induksjonen i lavdoseområdet kun kan føres tilbake til virkningen av holoprotein.

Immunstimulerende aktivitet

Den immunstimulerende virkning som biologisk aktivitet hos rekombinant mistellectin-holoprotein ble påvist som eksemplet med induksjon av en tumor-nekrose-faktor- α

(TNF- α)- og interferon- γ (INF- γ)-frisetting fra humane, mononukleære celler fra friske blodgivere (PBMC-modell) samt på eksemplet med induksjon av en interleukin-1 α (IL-1 α)- og interleukin-6 (IL-6)-frisetting i en kokultur av humane, primære keratino-cytter og hudfibroblaster (skin² ZK1200-modell). Således viste det seg i PBMC-
 5 modellen og på grunn av 3-48 ng/ml rekombinant rML-holoprotein, en dosisavhengig frisetting av TNF- α og INF- γ , i skin²-modellen ved 0,25-8 ng/ml rekombinant rML-holoprotein, en dosisavhengig frisetting av IL-1 α og IL-6.

Alle nevnte cytokiner er relevante, stimulerende mediatorer for det menneskelige
 10 immunsystem og hvis sentrale funksjoner ved aktiveringen fremfor alt er det cellulære immunsvær.

I motsetning til den kjente teknikk som fører den immunstimulerende aktivitet hoved-sakelig tilbake til lectinaktiviteten for B-kjeden (Hajto et al., 1990), kunne ingen av de
 15 ovenfor nevnte cytokinfrisettinger induseres kun med den rekombinante rMLB-kjede. Den immunstimulerende aktivitet kunne i lavdoseområdet kun oppnås ved funksjonell tilknytning av rML-holoprotein. Dette overraskende resultat tillater å trekke den slutning at de immunstimulerende preparater med vegetabilsk nMLB-kjede fremdeles inneholder spor av nMLB-holoprotein og at en nMLB-kjede tilskrevet immunstimulerende virkning
 20 er å føre tilbake til restinnholdet av nML. Mens de hittil beskrevne fremgangsmåter for fremstilling av nMLB i henhold til dette ikke muliggjør en kvantitativ separering av holoprotein, består med den rekombinante fremstilling av mistellectin-enkeltkjeder nå for første gang muligheten til å undersøke og å stille til disposisjon homogene mistellectin-B-kjedepreparater. Dette tillater for første gang en separat beskrivelse og
 25 anvendelse av de biologiske aktiviteter av A- og B-kjeden samt en differensiering av de biologiske aktiviteter av enkeltkjeder og funksjonelt tilknyttet holoprotein.

(VI) Biologiske aktiviteter for den rekombinante mistellectin-B-kjede (rMLB)

30 Som markør for aktiveringen av immunkompetente celler undersøkte man induksjonen av celleoverflateprotein CD69. CD69 opptrer som et av de første celleoverflate-antigener etter aktivering av T-celler, B-celler og særlig av "natural killer"-celler (naturlige dreperceller eller NK-celler). CD69 utgjør herved en aktiveringsmarkør for den ovenfor nevnte immunkompetente cellepopulasjon da celleoverflateprotein CD69
 35 eksprimeres på hvilende lymfocytter. I tillegg ble det for det induserbare CD69-overflateprotein påvist en fremmede funksjon for den cytolytiske aktivitet av NK-cellene og TcR γ / δ -T-cellene (Moretta et al., 1991). Ved Flow-cytometri, FACS, under

anvendelse av et anti-CD69 mAk kunne man i konsentrasjonsområdet fra 1-100 ng/ml fastslå en aktivisering av mononukleære celler både med henblikk på opptreden av CD69 på celleoverflaten og med henblikk på andelen av CD69-positive celler. Det viste seg herved en klokkeformet doseavhengighetskurve, noe som antydte nødvendigheten av en fornetning av cellulære reseptorer via begge ligandbindesetene av rMLB-kjeden. En cytotoksisk virkning på de her undersøkte PBMC kunne heller ikke i de høyeste konsentrasjoner av 100 ng/ml rMLB, påvises.

I en foretrukken utførelsesform oppviser oppfinnelsens polypeptider som minst en monomerene, et kjemisk eller enzymatisk modifisert polypeptid ifølge oppfinnelsen eller et fusjonsprotein ifølge oppfinnelsen.

Ved modifikasjoner kan man for det første optimalisere virkningsstyrken og man kan også, ved utkobling av enkelte virkningskvaliteter (for eksempel karbohydratbindingssetene i B-kjeden eller glykosidase-aktiviteten i A-kjeden) utvide de terapeutiske anvendelsesmuligheter idet eventuelle bivirkninger utelukkes. Polypeptider med endrede egenskaper kan også tjene som verktøy for oppklaring av virkningsmekanismene. For spesielle terapier kan det være nødvendig å redusere antigenisiteten og immunogeniteten for polypeptidene og/eller å optimalisere de farmakokinetiske egenskaper, noe som er mulig ved målrettet utbytting av enkelte aminosyrer.

Oppfinnelsen angår videre, i henhold til krav 18, en fremgangsmåte for fremstilling av oppfinnelsens polypeptid eller polypeptiddimer hvorved man dyrker oppfinnelsens vert under egnede betingelser og isolerer det således oppnådde polypeptid eller polypeptiddimer.

Fagmannen kjenner egnede betingelser for dyrking og isolering av verten. Således kan for eksempel oppfinnelsens polypeptid eller polypeptiddimer sluses ut av verten ved hjelp av et egnet ekspresjonssystem og samles i medium. På den annen side kan polypeptidet eller polypeptiddimeren forbli i cellen og isoleres fra denne. I det følgende presenteres det en ytterligere foretrukken utførelsesform av fremgangsmåten:

For isolering av rMLA ble det gjennomført en totalcelleoppslutning med en egnet ekspresjonsvektor transformert E. coli-celle og en separering av oppløselige fra uoppløselige cellebestanddeler ved sentrifugering. En analyse av cellefraksjonen viste at den rekombinante mistellectin A-kjede, avhengig av ekspresjonsbetingelsene og

ekspresjonsvarigheten, ble akkumulert i oppløselig form i en mengde av 5-50% henholdsvis i form av ikke-oppløselige proteinaggregater ("inclusion bodies") i en mengde av 50-95%.

- 5 Oppkomsten av oppløselige og uoppløselige proteiner gir, når en tilbakefolding henholdsvis renaturering av rMLA-proteinet er mulig, minst to metoder for isolering av rMLA. Det rMLA som er aggregert til "inclusion bodies" ble etter vasking av sedimentene for fjerning av *E. coli*-proteiner (Babbitt et al., 1990) oppløst under denaturerende betingelser og foldet tilbake ved 90-gangers fortynning i en foldingsbuffer (50 mM
10 Tris-HCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8,0).

- Efter denne prosedyre fant man på den ene side oppløselige, foldede proteinspecier som, som vist i figur 9, på samme måte som de renaturerte, opprinnelig ikke-oppløselige, denaturerte rMLA-specier, er fullt ut enzymatisk aktive. En isolering av det renaturerte
15 rMLA kan på samme måte som isoleringen av den oppløselige rMLA skje ved immunoaffinitetskromatografi under anvendelse av det spesifikke anti-MLA-antistoff TA5 (Tonevitsky et al., 1995).

- Med nærværet av rMLB i oppløselig form og også i form av ikke-oppløselige "inclusion
20 bodies" har man to fremgangsmåter for isolering av rekombinant mistellecin-B-kjede.

- For isolering av den oppløselige rMLB-kjede fra det sterkt reduktive miljø i *E. coli*-cytoplasmaet gjennomføres det for å tildanne de intrakene disulfidbroer en inkubering i nærvær av et redoks-system av redusert og oksydert glutation samt for stabilisering av
25 aktive foldingsprodukter i nærvær av liganden β -laktose. Fra foldingssatsen ble det selektivt isolert, henholdsvis rensset karbohydratdannende rMLB-kjeder ved affinitetskromatografi på laktosyl-agarose eller N-acetyl-galaktosamin-agarose i en 1-trinns metode.

- 30 For isolering av rMLB fra den uoppløselige, som "inclusion bodies" foreliggende ekspresjonsproduktandel, ble sedimentet fra *E. coli*-totalcelleoppslutningen vasket for å fjerne *E. coli*-proteiner (Babbitt et al., 1990) og oppløst under denaturerende og reduserende betingelser. Renatureringen skjedde ved fortynning i nærvær av et redoks-system av redusert og oksydert glutation samt liganden β -laktose, hvorved aktive
35 karbohydrat-bindende rMLB-kjeder ble isolert og rensset selektivt fra renatureringssatsen ved affinitetskromatografi på N-acetyl-galaktosamin-agarose eller laktosyl-agarose.

Oppfinnelsen angår i tillegg et legemiddel som inneholder oppfinnelsens polypeptid eller oppfinnelsens polypeptiddimer og/eller det nedenfor beskrevne immunotoksin ifølge oppfinnelsen, eventuelt sammen med en farmasøytisk godtagbar bærer.

- 5 Oppfinnelsens polypeptider, deres assosiater eller modifikasjoner, egner seg for diverse anvendelser innenfor kreft- og infeksjonsterapien tilsvarende de for de naturlige mistellectinkjente, farmakologiske egenskaper.

De immunstimulerende virkninger kan utnyttes for tumorterapi idet man ved direkte
10 og/eller indirekte stimulering av kroppens eget immunforsvar blir i stand til å bekjempe tumoren og eventuelle metastaser på mer virksom måte. Det samme gjelder også for infeksjoner og særlig virale sykdommer. Oppfinnelsens polypeptider kan også administreres i kombinasjon med andre immunstimulerende midler, for eksempel interferoner, cytokiner eller kolonistimulerende faktorer, for å oppnå synergistiske
15 virkninger, henholdsvis for å redusere den nødvendige dose av kombinasjonspartneren og derved også deres bivirkninger.

I kombinasjon med cytostatika eller bestråling kan bivirkningene ved leukopeni/myelosuppresjon reduseres eller mildnes slik at de ved slik behandling i dag vanlige
20 svekninger i immunsystemet kan reduseres.

Den direkte, cytotoksiske virkning av polypeptidene med glykosidase-aktivitet fører til apoptose av tumorceller og kan likeledes utnyttes for terapi. Dette prinsipp kan gjøres spesifikt ved anvendelse av immunotoksiner når oppfinnelsens polypeptider kobles til
25 egnede antistoffer. Derved angår oppfinnelsen også immuntoksiner som i det minste omfatter et polypeptid eller en polypeptiddimer ifølge oppfinnelsen. For eksempel kan en kobling av aktiv A-kjede eller holoprotein skje på antistoffer eller fragmenter derav ved proteinkjemiske metoder. Slike koblingsmetoder er kjent for fagmannen og de tilsvarende konjugater kan anvendes på mange områder (Vitetta, 1993). Alternativt kan
30 også tilsvarende konstruerte fusjonsproteinkonstrukter bringes til ekspresjon, som inneholder antigen-bindende domener av for eksempel antistoffer og i tillegg cytotoxiske fragmenter av oppfinnelsens polypeptid.

I tillegg kan dannelsen av metastaser forhindres når bindingen av tumorceller til andre
35 celler inhiberes. Via kompetitiv lectinbinding kan man med oppfinnelsens polypeptider forhindre denne binding.

I tillegg angår oppfinnelsen diagnostiske preparater som minst inneholder:

- (a) et nukleinsyremolekylet ifølge ett av kravene 1 til 5;
- (b) en primer og/eller et primerpar som spesifikt hybridiserer med
5 nukleinsyremolekylet i a) eller en komplementær tråd av denne; og/eller
- (c) polypeptidet ifølge ett av kravene 13 til 15 og/eller polypeptiddimeren ifølge krav
16 eller 17.

Oppfinnelsens diagnostiske blanding kan i den utførelsesform som inneholder primeren
10 henholdsvis primerparet, benyttes for å av søke organismen etter nærværet av et
lectingen for derved for eksempel å finne nye lectingener som eventuelt koder
farmakologisk interessante lectiner. Også det i oppfinnelsens diagnostiske blanding
foreliggende nukleinsyremolekyl ifølge oppfinnelsen kan, for eksempel i Southern-blott-
metoder eller Northern-blott-metoder, anvendes for å av søke organismene på nærværet
15 av tilsvarende lectingener. Ved variasjon av hybridiseringsstrigensen kan man i tillegg
søke etter beslektede lectingener. Polypeptidet eller polypeptiddimeren kan for eksempel
anvendes for å generere antistoffer eller antisera med hvilke man for eksempel i henhold
til kjente metoder kan detektere tilsvarende (mistel)lectiner i forskjellige organismer.

20 Oppfinnelsen skal forklares nærmere under henvisning til de ledsagende figurer, der:

- Figur 1 viser konstruksjonen av de primære amplifikasjonsoligonukleotider;
- figur 2 viser det primære Viscum-album ML-amplifikasjonsprodukt;
- figur 3 viser kloningsstrategien for fremstilling av ML-genet;
- 25 figur 4 viser innskyting av ekspresjonsvektoren for rMLA og rMLB og fullstendig
ML-gensekvens;
- figur 5 konstruksjonsskjema for ekspresjonsvektoren for rMLA;
- figur 6 konstruksjonsskjema for ekspresjonsvektoren for rMLB;
- figur 7 viser ekspresjonen av rMLA, rMLB og immunologisk detektering;
- 30 figur 8 viser IEF-kromatofokusering av rMLA og rMLB mot nat. ML;
- figur 9 den enzymatiske aktivitet av rMLA (RIP);
- figur 10 viser karbohydrat-bindekarakteristikken av rMLB;
- figur 11 viser MOLT4-cytotoksisiteten av rML;
- figur 12 viser induksjonen av apoptose ved rML;
- 35 figur 13 viser den immunostimulerende virkning av rekombinant mistellecin i en
PBMC-modell;

figur 14 viser den immunstimulerende virkning av rekombinant mistellectin i skin²-modellen; og

figur 15 viser induksjonen av celleoverflatemarkøren CD69 i PBMC.

- 5 De følgende eksempler skal illustrere oppfinnelsen.

Eksempel 1

Konstruksjon av de primære amplifikasjonsoligonukleotider

- 10 Mistellectin, ML, hører til klassen ribosom-inaktiverende proteiner (Stirpe et al., 1992) som utgjør en utbredt proteinfamilie i planter av forskjellig taksonomisk opprinnelse. ML ble på grunn av aktivitetene til underenhetene tilordnet gruppen type II ribosom-inaktiverende proteiner (Endo et al., 1988a).
- 15 For å fastslå ML-gensekvensen er den nærliggende teori med gjennom søking av *Viscum-album* cDNA- og genomiske genbanker dog uegnet. Således var det ikke mulig å identifisere ML-spesifikke kloner i genbanker fra *Viscum-album*-poly-A⁺-RNA på tross av anvendelsen av forskjellige DNA-sonder. Under den antagelse at ML-gensekvensen ikke inneholder introner, ble det derfor anvendt en PCR-strategi. Da den
- 20 N-terminale aminosyresekvens er kjent både for MLA- og MLB-kjeden (Dietrich et al., 1992; Gabius et al., 1992), syntes en amplifikasjon av det MLA-kodende området mulig under anvendelse av degenererte og fra kjente peptider avledede amplifikasjonsoligonukleotider (figur 1a). Mens et brukbart oligonukleotid med lav degenerasjonsgrad kan avledes fra N-terminus av MLA-kjeden (RMLA1, figur 1b), er
- 25 det ikke mulig å konstruere tilsvarende nukleotider med tilstrekkelig spesifisitet fra N-terminus av MLB-kjeden (RMLB1, RMLB2, RMLB3, figur 1b).

- Det måtte derfor utvikles alternative strategier som under anvendelse av proteindata til beslektede proteiner muliggjorde å avlede amplifikasjonsoligonukleotider fra fremdeles
- 30 ukjente ML-sekvensområder. Således viste en aminosyre-analyse av type I- og type II-ribosominaktiverende proteiner et antall konserverte områder med høy sekvens-homologi. Figur 1c viste den høye grad av slektskap til type I og type II når det gjelder det aktive sentrum av ricin. Innenfor sekvensmotivet MISEAARF ble det for E177 og R180 diskutert en deltagelse i den enzymatiske mekanisme (Kim et al., 1992; Lord et
- 35 al., 1994). Derfra kunne man slutte at i det minste disse to rester kunne være til stede i ML-sekvensen. Fra ytterligere, strukturelle betraktninger med henblikk på nærværet av enkelte rester hvorved særlig slike med en lav degenereringsgrad av kodonbruken, ble

tatt hensyn til, resulterte konstruksjonen i amplifikasjonsoligonukleotidet RMLA2. Sekvensen av dette oligonukleotid er vist i figur 1c.

Eksempel 2

5 **Fremstilling av ML-gen-spesifikke DNA-fragmenter**

Høymolekylært, genomisk DNA ble isolert ved å gå ut fra friske *Viscum album*-blad (vertstre *Populus wilsonii*) i henhold til metoden ifølge Baur et al. (1993). For fremstilling av ML-gen-spesifikke DNA-fragmenter ved PCR ble det pr. amplifikasjonssats
 10 anvendt 100 ng genomisk DNA. Amplifikasjonen skjedde i et totalvolum på 50 µl inneholdende PCR-buffer (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 0,25 mM dNTP, pH 8,3), 78 pmol Primer RMLA1 og 50 pmol (sats 2) henholdsvis 100 pmol (sats 1) RMLA2. PCR skjedde med Taq-DNA-polymerase (1,5E pr. sats) fra Boehringer Mannheim med en Biometra Thermocycler. PCR-parametrene var: 1 minutt
 15 denaturering 90°C, 1 minutt annealing 50 °C, 1 minutt forlengelse 72°C ved til sammen 30 cykler. Amplifikasjonsproduktene ble analysert ved 5 %-ig polyakrylamidgel-elektroforese og farving med etidiumbromid (figur 2). Det i sats 2 oppnådde, spesifikke amplifikasjonsprodukt med en størrelse på rundt 500 bp ble isolert ved geleluering og ført til kloningen i TA-vektoren.

20

Eksempel 3

Kloningsstrategi

Oppnåelsen av de ved den primære PCR anvendte amplifikasjonsoligonukleotider er
 25 vist i eksempel 1 (figur 1a), fremstillingen av det primære genfragment av *Viscum album* ML-genet, i det følgende betegnet som "a", er vist i eksempel 2 (figur 2). Ved å gå ut fra sekvensen av det klonede genfragment "a" og den antagelse at ML-genet ikke har introner, var det så mulig å avlede det sekvensspesifikke 5'-oligonukleotidet med hvilket det var mulig en amplifisering av fragmentene "b", "c", "d" og "e". Mens 3'-
 30 oligonukleotidet for "c" likeledes ble avledet fra DNA-sekvensen av "a", måtte konstruksjonen av den degenererte 3'-primer for forsterkning av genfragmentene "b", "d", "e" og "g" skje ved analyse av homologe områder av type I ("b")- og type II ("d", "e", "g")-RIP-proteiner. Herved trakk man nok engang slutninger fra sekvenssammenligning innenfor proteinfamilien med henblikk på nærværet av enkelte
 35 rester, hvorved særlig rester med lav degenerasjonsgrad av kodonbruken ble tatt hensyn til. Særlig benyttet man de kjente ricin- og abrin-cDNA- og avledede proteinsekvenser for konstruksjon av ca. 50 ML-spesifikke oligonukleotidkombinasjoner. I figur 3 er alle

genfragmenter vist som var klonbare som spesifikke amplifikasjonsprodukter og som kunne bringes til en ytterligere analyse. Ut fra andre oligonukleotidkombinasjoner kunne det ikke genereres noen ML-spesifikke amplifikasjonsprodukter. Fremstillingen av genfragment "f" (som koder for MLA-kjeden) og "g" (som koder for MLB-kjeden) er beskrevet i detalj i eksempel 5 og eksempel 6.

For analyse av 5'- og 3'-områdene av de translerte og ikke-translerte sekvensområder av ML-genet ble det etablert betingelser for 5'- og 3'-RACE (Frohmann et al., 1988) som førte til generering av fragmentene "h", "i" og "j". Amplifikasjonen av fragmentet "j" med RACE-PCR er derved et alternativ for fremstilling av fullstendige MLB-genfragmenter. RACE-reaksjonen ble gjennomført under anvendelse av cDNA som ble preparert ved reverstranskripsjon av isolerte *Viscum album* total-RNA fra mistelblad (vertstre *Populus wilsonii*).

Eksempel 4

DNA-sekvens og translasjonsproduktene rMLA og rMLB

Innskuddene av ekspresjonsvektorene pT7-MLA og pT7-MLB ble sekvensert ved standardmetoder ved hjelp av "primer walking"-strategi (bestemmelse av fullstendig overlappende sekvenser av to strenger) under anvendelse av forskjellige, ML-spesifikke oligonukleotider (figur 4a, b). De understrekede sekvensområder betegner restriksjonskuttetser for kloning i pT7-ekspresjonsvektorene. Begge genfragmenter er modifisert tilsvarende konstruksjonsskjemaet av ekspresjonsvektorene som beskrevet i eksempel 5 og eksempel 6.

Figur 4c viser den fra de betegnede fragmenter avledede, fullstendige ML-gensekvens. Den omfatter også 5'- og 3'-ikke-translerte områder samt endopeptid- og signalpeptidkodende avsnitt.

Eksempel 5

Konstruksjon av ekspresjonsvektoren pT7-MLA

For heterolog ekspresjon fremstilte man den for mistellectin-A-kjeden kodende sekvens ved spesifikk PCR ved å gå ut fra kompleks, genomisk mistel-DNA og den ble derefter terminalmodifisert. Via ikke-komplementære områder av de anvendte primer-oligonukleotider ble det her føyet til translasjonskontrollelementer samt erkjennelsessekvenser som restriksjonsendonukleaser hvorved det, ved å gå ut fra det

genomiske foreliggende prepromistellectingen var mulig å klone og separat å uttrykke mistellectin-A-kjeden.

Figur 5b viser fremstillingen av MLA-kodende genfragmenter ved PCR. For fremstilling av den MLA-kodende gensekvens ble 200 ng genomisk *Viscum album* DNA, 1,5 mM (sats 1) henholdsvis 2,5 mM (sats 2) magnesiumklorid, 40 pmol av hvert primer-oligonukleotid RML16 og RML17 i PCR-buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,25 mM av hver dNTP, pH 8,3) i et totalvolum av 50 µl anvendt. PCR skjedde under anvendelse av Taq-polymerase (1,5 E pr. sats, Boehringer Mannheim) ved totalt 30 cykler med temperaturprofilen 1 minutt denaturering ved 94°C, 1 minutt annealing ved 52°C, 1,5 minutt forlengelse ved 72°C. Amplifikasjonsproduktene ble analysert ved 1% agarosegel-elektroforese og farving med etidiumbromid (figur 5b) og tilført TA-vektorer ved geleluering av kloningen.

5'-området av den for rMLA-kodende sekvens tilsvarende aminosyrerestene tyrosin¹ - tyrosin¹⁷ (Dietrich et al., 1992; Gabius et al., 1992) ble fremstilt under forkobling av et translasjonsstartkodon som syntetisk genfragment ved hybridisering og kloning av to oligonukleotider. Herved ble det oppnådd en optimalisering av gensekvensen med henblikk på kodonvalget slik det er beskrevet for sterkt eksprimerte gener i *Escherichia coli* (Gribskov et al., 1984). Ved 3'-enden av det syntetiske rMLA-genfragment samt ved 5'-enden av det ved hjelp av PCR fremstilte rMLA-genfragment innførte man ved målrettet utbytting av tyrosin¹⁷-kodonet i TAC med TAT, et SspI-restriksjonskuttsete som muliggjorde en fusjon mellom de to rMLA-genfragmenter under fremstilling av en vektor pML14-17 (figur 5).

Den genererte fullstendige, for rMLA-kodende sekvens ble bekreftet ved DNA-sekvensering (figur 4a). For ekspresjon av rMLA i *Escherichia coli* ble gensekvensen fra vektoren pML14-17 isolert og ved innskyting i ekspresjonsvektoren pT7-7 stilt under kontroll av T7-RNA-polymerasepromoterens samt transkripsiterminatoren. Med den resulterende ekspresjonsvektor pT7-MLA (figur 5) ble *E. coli*-ekspresjonsstammen BL21, transformert.

Eksempel 6

Konstruksjon av ekspresjonsvektoren pT7-MLB

For heterolog ekspresjon av mistellectin-B-kjeden ble den fullstendige, MLB-kodende sekvens amplifisert ved spesifikk PCR fra kompleks, genomisk *Viscum album* DNA,

hvorved translasjonskontrollelementer samt erkjennelsessekvenser for restriksjonsendonukleasene ble innført via ikke-komplementære områder av de anvendte primer-oligonukleotider.

- 5 Figur 6b viser fremstillingen av det totale, rMLB fullstendig kodende genfragment, ved PCR. Amplifikasjonen av det rMLB-kodende DNA-fragment skjedde fra hver gang 200 ng genomisk *Viscum album* DNA i PCR-satser med 50 pmol primer-oligonukleotid RML25 og 30 pmol (sats 1) henholdsvis 10 pmol (sats 2) primer-oligonukleotid RML26 i et totalvolum på 50 µl PCR-buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂,
10 0,25 mM av hver dNTP, pH 8,3). PCR skjedde under anvendelse av Taq-polymerase (1,5 E pr. sats, Boehringer Mannheim) ved 30 cykler bestående av 1 minutt denaturering ved 94°C, 1 minutt annealing ved 52° og 1,5 minutter forlengelse ved 72°C. PCR-produktene ble analysert ved 1 %-ig agarosegel-elektroforese og farving med etidiumbromid. Det oppsto et 0,8 kbp PCR-produkt som ble isolert ved geleluering og der
15 kloningen ble tilført TA-vektorer. Ved innskyting i ekspresjonsvektoren pT7-7 ble det rMLB-kodende genfragment satt under kontroll av transkripsjonselementet og ekspresjonsstammen *E. coli* BL21 ble transformert med den resulterende ekspresjonsvektor pT7-MLB. Integriteten av de PCR-genererte, fullstendige og for rMLB-kodende sekvens ble bekreftet ved DNA-sekvensering (figur 4b).

20

Eksempel 7

Ekspresjon, immunologisk påvisning, tilbakefolding og in vitro-reassosiasjon av rMLA og tMLB

25 (I) *Ekspresjon av rMLA i E. coli*

- For ekspresjon av rekombinant mistellecin-A-kjede ble 1000 ml LB_{Amp}-medium i 2 liters ristekolber med støtplater podet med 5 ml av en stasjonær dyrket LB_{Amp}-forkultur av *E. coli* BL21/pT7-MLA og dyrket ved 37°C under risting, hvorved veksten ble fulgt ved ukklarhetsmålinger ved 578 nm. Genekspresjonen ble indusert ved oppnåelse av en
30 celledensitet tilsvarende OD₅₇₈ ≈ 0,9-1,0, ved tilsetning av 0,5 mM IPTG. For innhøsting ble cellene sedimentert i 2 timer etter induksjon ved sentrifugering i 20 minutter ved 5000 omdr./min. og 4°C i GS-3-rotor (Sorvall) og kulturmediet ble dekantert, hvorved man ved å gå ut fra 1 liter kulturvolum isolerte en cellemasse på 3-4 g fuktig vekt.

35

Celleoppslutning skjedde ved hjelp av French-presse (SLM Instruments), hvorved celledsedimentet ble resuspendert i 20 ml oppslutningsbuffer (50 mM Tris-HCl, 100 mM

NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, pH 8,0) og oppsluttet ved 2 French-press gjennomløp ved 1500 psi. Ved en etterfølgende sentrifugering i 30 minutter ved 10 000 omdr./min. og 4°C i en SS-34-rotor (Sorvall) ble uoppløselige cellebestanddeler samt inneholdte "inclusion bodies" sedimentert og separert fra de i supernatanten
 5 gjenværende, oppløselige E. coli-proteiner henholdsvis oppløselige ekspresjonsprodukter.

For analyse av ekspresjonen undersøkte man like volumer av celleoppslutningsreaksjonsfraksjoner ved 12,5% SDS-polyakrylamidgel-elektroforese
 10 og coomassie-brilliant-blå farving samt ved Western-blott under anvendelse av det MLA-spesifikke antiserum TA5 (figur 7a). Det monoklonale antistoff TA5 (Tonevitsky et al., 1995) ble stilt til disposisjon av forfatteren. Som også de andre, her anvendte antistoffer er de fremstillbare ved standardmetoder under anvendelse av det tilsvarende immunogen (når det gjelder TA5 er dette ML-1 eller MLA). For å påvise ekspresjonen
 15 ble like volumer av de oppløselige faktorer (spor, 2, 4, 6, 8) samt de ikke-oppløselige "inclusion bodies"-fraksjoner (spor 1, 3, 5, 7) av E. coli-oppslutningen undersøkt med henblikk på innholdet av rMLA. For fremstilling av ekspresjonsforløpet ble derved prober anvendt før (spor 1+2), 2 timer (spor 3+4), 4 timer (spor 5+6) og 6 timer (spor 7-8) etter induksjonen av genekspresjonen. Ekspresjonen karakteriseres allerede 1 time
 20 etter induksjon ved opptreden av et immunreaktivt 25 kDa-ekspresjonsprodukt tilsvarende rMLA, hvis ekspresjonsmaksimum er nådd allerede 2 timer etter induksjon. Fordelingen av rMLA på det oppløselige henholdsvis ikke-oppløselige, celleoppslutningsfraksjoner utgjorde 2 timer etter induksjon begge rundt 50%, hvorved en lengere ekspresjonstid fører til en tiltagende dannelse av ikke-oppløselige "inclusion
 25 bodies".

(II) Isolering av rMLA fra ikke-oppløselige "inclusion bodies"

Sedimentet fra E. coli-totalcelleoppslutningen ble, for å fjerne E. coli-proteiner, vasket med 2 x 20 ml STET-buffer (50 mM Tris-HCl, 8 % vekt/volum sukrose, 50 mM EDTA,
 30 1,5 volum-% Triton X-100, pH 7,4) i henhold til Babbitt et al. (1990). Det gjenværende segment med de tilstedeværende "inclusion bodies" ble oppløst i 20 ml denatureringsbuffer (6M guanidiniumklorid, 100 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) ved inkubering i 16 timer ved romtemperatur under risting.

35 For renaturering av rMLA ble den i denatureringsbufferen foreliggende protein-oppløsning langsomt dryppet inn i et 90-ganger stort volum foldingsbuffer (50mM Tris-HCl, 2 mM DTT, 1 mM EDTA, pH 8,0) og inkubert i 16 timer ved romtemperatur

under omrøring. Igjen utfelte protein ble separert ved sentrifugering i 30 minutter ved 6000 omdr./min. og 4°C i en GS-3-rotor (Sorvall). Den rMLA-holdige supernatant ble for lagring innstilt til 20% volum/volum glycerol og oppbevart ved 4°C.

5 (III) *Rensing av rMLA ved immunoaffinitetskromatografi*

For 1-trinnsrensing av rMLA (oppløselig ekspresjonsproduktandel henholdsvis tilbakefoldet protein) ved immunoaffinitetskromatografi ble 260 µg av et mot mistellectin-A-kjede rettet, monoklonalt antistoff anti-nMLA-IgG (TA5, Tonevitsky et al., 1995) immobilisert kovalent på protein-A-Sepharose CL4B (Sigma, Deisenhofen) i henhold til
 10 den metode som er beskrevet av Harlow & Spur (1988). etter inkubering av immunoaffinitetsmatriksen med rMLA-proben og vasking av matriksen med 10 søylesjikt volum vaskebuffer 1 (1M NaCl, 10 mM fosfatbuffer, pH 7,0) og 10 søylesjikt volum vaskebuffer 2 (10 mM fosfatbuffer, pH 7,0) for fjerning av ikke-spesifikt bundede proteiner, ble spesifikt bundet rMLA eluert med elueringsbuffer (0,1M glycine, pH 2,5).
 15 Elueringen skjedde ved en tilbakestilling av pH-verdien i en forkobling på 1M fosfatbuffer, pH 8,0.

(IV) *Ekspresjon av rMLB i E. coli*

For ekspresjon av rekombinant mistellectin-B-kjede ble 1000 ml LB_{Amp}-medium i 2
 20 liters ristekolbe med støtplater podet med 5 ml av en stasjonær dyrket LB_{Amp}-forkultur av E. coli BL21/pT7-MLB og dyrket ved 37°C under risting, hvorved veksten ble fulgt ved blakningsmåling ved 578 nm. Genekspresjonen ble indusert når det var nådd en celledensitet tilsvarende OD₅₇₈ ≈ 0,9-1,0 ved tilsetning av 0,5 mM IPTG. For høsting ble cellene sedimentert i 4 timer etter induksjon ved sentrifugering i 20 minutter ved
 25 5000 omdr./min. og 4°C i en GS-3-rotor (Sorvall) og kulturmediet dekantert.

Celleoppslutningen skjedde ved hjelp av French-PressTM (SLM Instruments) hvorved celledensitat ble resuspendert i 20 ml oppslutningsbuffer B (20 mM fosfatbuffer, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH 7,2) og oppsluttet ved 3 French-Press
 30 gjennomløp ved 1500 psi. Ved en derpå følgende sentrifugering i 30 minutter ved 10 000 omdr./min. og 4°C i SS-34-rotor (Sorvall) ble uoppløselige cellebestanddeler samt tilstedeværende "inclusion bodies" sedimentert og separert fra de i supernatanten gjenværende, oppløselige E. coli-proteiner henholdsvis oppløselige ekspresjonsprodukter.

35

For påvisning av ekspresjonen ble like volumer av celleoppslutningsfraksjonen undersøkt ved 12,5% SDS-polyakrylamidgel-elektroforese og coomassie-brilliant-blå

farving samt ved Western-blott under anvendelse av det MLB-spesifikke antiserum TB33 (figur 7b). Det monoklonale antistoff TB33 (Tonevitsky et al., 1995) ble stilt til disposisjon av forfatteren. Det ble fremstilt under anvendelse av standardmetoder. Tilsvarende antistoffer er fremstillbare for fagmannen, likeledes under anvendelse av standardmetoder med ML-1 eller MLB som immunogen. For påvisning av ekspresjonen undersøkte man like volumer av den oppløselige fraksjon (spor 2, 4, 6, 8) samt den uoppløselige "inclusion bodies"-fraksjon (spor 1, 3, 5, 7) fra E.coli-oppslutningen, med henblikk på innholdet av rMLB. For visning av ekspresjonsforløpet ble det derved anvendt prober foran (spor 1+2), 2 timer (spor 3+4), 4 timer (spor 5+6) og 6 timer (spor 7-8) etter induksjon av genekspresjonen. Western-blott-analysen viste allerede 1 timer etter induksjon opptreden av et immunreaktivt 31 kDa-proteinbånd tilsvarende rMLB, hvorved ekspresjonsmaksimum ble nådd 4 timer etter induksjon. 4 timer etter induksjon var fordelingen av rMLB-mengden rundt 50% på den oppløselige, henholdsvis ikke-oppløselige fraksjon av celleoppslutningen. Lengere inkubasjonstidsrom førte til en tiltagende akkumulering av eksprimert rMLB i form av uoppløselige "inclusion bodies".

(V) Isolering av rMLB fra ikke-oppløselige "inclusion bodies"

Sedimentet av E. coli-totalcelleoppslutningen ble, for å fjerne E. coli-proteiner, vasket med 2 x 20 ml STET-buffer (50 mM Tris-HCl, 8% vekt/volum sukrose, 50 mM EDTA, 1,5 volum-% Triton X-100, pH 7,4) i henhold til Babbitt et al. (1990). Det gjenværende sediment med de tilstedeværende "inclusion bodies" ble oppløst i 20 ml denatureringsbuffer (6M guanidiniumklorid, 100 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) ved inkubering i 16 timer ved romtemperatur under risting.

For renaturering av rMLB ble den i denatureringsbufferen foreliggende proteinoppløsning langsomt dryppet inn i det 90-ganger store volum av foldingsbuffer (20 mM fosfatbuffer, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 100 mM glukose, 10 volum-% glycerol, 10 mM β -laktose, pH 5,5) og inkubert i 16 timer ved romtemperatur. Nyutfelt protein ble, ved sentrifugering i 30 minutter ved 6000 omdr./min. og 4°C i GS-3-rotor (Sorvall), separert fra den oppløselige, foldede rMLB-fraksjon.

(VI) Isolering av rMLB ved affinitetskromatografi på N-acetyl-D-galaktosamin-agarose

For isolering av aktivt, karbohydrat-bindende rMLB ekviliberte man en N-acetyl-galaktosamin-agarose-affinitetsmatriks (PIERXE, USA) med 10 søylesjiktvolumer kromatografibuffer (50 mM fosfatbuffer, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 volum-% glycerol, 0,05 volum-% Tween®-20, pH 7,0). Prøvepåføringen skjedde ved "batch"-inkubering av affinitetsmatriks i rMLB-holdig prøveoppløsning i minst 2 timer ved 4°C.

etter vasking av affinitetsmatriksen med kromatografibuffer for å fjerne ikke-spesifikt bundet protein ble bundet rLMB eluert ved kompetitiv fortrenkning med 0,3M N-acetyl-galaktosamin i kromatografibuffer, pH 4,0.

5 (VII) *In vitro*-reassosiasjon av mistellectin-kjeder for fremstilling av holoproteinet

Fremstillingen av rekombinant mistellectin-holoprotein (rML) kan skje ved å gå ut fra isolerte, foldede og også ved å gå ut fra denaturerte og innenfor rammen av en ko-folding renaturerte mistellectin A- og mistellectin B-kjeder. For reassosiasjon av isolerte, foldede enkeltkjeder inkuberte man isolert, mistellectin-B-kjede (nMLB eller
10 rMLB) med et molart overskudd av rMLA i 20 mM fosfatbuffer, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,2 i 16-48 timer ved 4°C. For å danne den interkenære disulfidbro skjedde inkuberingen i nærvær av et redoks-system av 6 mM glutation (forhold redusert:oksydert 5:1) eller 10 mM glutation (forhold redusert:oksydert 2:1) + 1 µM protein-disulfid-isomerase (Boehringer Mannheim).

15

For reassosiasjon ved å gå ut fra denaturerte enkeltkjeder innenfor rammen av ko-folding ble rMLA-kjeden oppløst i 6M guanidiniumklorid, 2 mM DTT, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 til en konsentrasjon av 2 mg/ml. rMLB-kjeden ble, for fullstendig reduksjon av cysteinrestene, oppløst i 6M guanidiniumklorid, 100 mM DTT, 50 mM
20 Tris-HCl, pH 8,0 og ombufret etter en inkubasjonstid i 20 minutter ved romtemperatur på 6M guanidiniumklorid, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 ved hjelp av gelpermeasjon på PD-10 (Pharmacia, Sverige) og innstill til en konsentrasjon på 200 µg/ml. Reassosiasjonen skjedde innenfor rammen av en kofolding av rMLB med et molart overskudd av rMLA ved langsom 1:30-fortynning med guanidiniumoppløsningen i koblingsbuffer (50 mM
25 natriumfosfatbuffer, 50 mM KCl, 1 mM EDTA, 10 volum-% glycerol, 100 mM glukose, 20 mM laktose, pH 8,0) og inkubasjon i 16 timer ved 4°C. For å tildanne den interkenære disulfidbro skjedde inkuberingen i nærvær av et redoks-system av 2 mM glutation (redusert:oksydert 1:1).

30 Koblingsansatsene ble dialysert med lagringsbuffer (50 mM Natriumfosfatbuffer, 300 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 volum-% glycerol, 0,05 volum-% Tween®-20, pH 8,0). Påvisning og identifisering av den dannede heterodimer skjedde ved SDS-PAGE under ikke-reducerende betingelser og derpå følgende Western-blott-analyse under anvendelse av spesifikke, monoklonale antistoffer mot mistellectin-A-kjede (TA5) henholdsvis
35 mistellectin-B-kjede (TB33). Isoleringen av de dannede holoproteiner, henholdsvis separering av fri rMLA henholdsvis rMLA-aggregater, skjedde ved affinitets-

kromatografi på N-acetyl-galaktosamin-sepharose eller laktosyl-agarose som beskrevet under (VI).

Eksempel 8

5 **Isoelektrisk homogenitet av rMLA og rMLB**

1-2 µg rMLA, naturlig MLA, rMLB, naturlig MLB eller ML-holoprotein ble fokusert sammen med IEF-proteinstandarder (BioRad, USA) på Servalyt PreNetz IEF-geler (pH 3-10, 125 x 125 mm, 150 µm, Serva Heidelberg). For påvisning ble proteinene
 10 immobilisert ved "semi-dry elektroblotting" på nitrocellulosemembraner (0,2 µm, Schleider & Schüll, Dassel). Den immunologiske farving skjedde ved hjelp av et monoklonalt, MLA-spesifikt antistoff (TA5, Tonevitsky et al., 1995) for rMLA og nMLA henholdsvis ved hjelp av et monoklonalt, MLB-spesifikt antistoff (TB33, Tonevitsky et al., 1995) for rMLB, nMLB og ML-holoprotein. Immunkomplekser ble farvet under
 15 anvendelse av et med alkalisk fosfatase konjugert anti-muse IgG-IgG (Sigma, Deisenhofen) og omsetning av substratene NBT og BCIP (figur 8).

Mens høyren, vegetabilsk mistellectin-A-kjede og også høyren mistellectin-B-kjede viser seg som isoelektrisk inhomogene proteiner med isoelektriske punkter for nMLA på 5,2 : 6,4 : 5,5 : 6,2 henholdsvis for nMLB på 7,1 : 7,3, viser den rekombinante
 20 rMLA-kjede med et isoelektrisk punkt på 6,8 og også den rekombinante rMLB-kjede med et isoelektrisk punkt på 5,1, seg som homogent protein (figur 8). Derved gir det seg for naturlig ML-holoprotein et heterogent antall av molekylvarianter (figur 8, nederst), mens den enhetlige mobilitet av rekombinante mistellectinproteiner dokumenterer
 25 homogeniteten for rML overfor mikroheterogeniteten til de vegetabiliske mistellectiner.

Eksempel 9

Påvisning av den enzymatiske, ribosom-inaktiverende aktivitet av rMLA

30 Proteinkonsentrasjonen for den ved hjelp av immunoaffinitetskromatografi rensede rMLA (tilbakefoldet) og rMLA (oppløselig) samt den til naturlig MLA-kjede (nMLA) ble bestemt i henhold til Bradford 81976) under anvendelse av en BSA-standard.

For påvisning og for kvantifisering av den enzymatiske rRNA-N-glykosidase-aktivitet
 35 av MLA etablerte man under anvendelse av "TNT coupled reticulocyte system" (Promega, USA) et ikke-radioaktivt testsystem. Pr. sats ble den samme mengde på 20 µl av TNT-systemet forinkubert i 15 minutter ved 30°C. For kvantifisering av en

- translasjonsinhibering ble det til kontrollsatsene satt 2 μ l av den tilsvarende buffer henholdsvis til testsatsene, 2 μ l stigende MLA-fortynninger (konsentrasjonsområde 350-0 pM). Fra hver sats tok man to prøver i avstander på 8 minutter og disse ble fryst ned i flytende nitrogen for å stanse reaksjonen. Som mål på translasjonsaktiviteten bestemte man den relative luciferasemengde (sqrt-cpm) ved en bioluminescenstest ved hjelp av et scintillasjonsmåleapparat. For hver sats fastslo man herved differansen mellom målt sqrt-cpm for de to tidsprøver som mål på den relative translasjonsaktivitet, hvorved aktiviteten i kontrollsatsen uten RIP ble satt til ved inaktiveringsgrad (IAR) på 0%.
- Ved å føre de relative translasjonsinaktiveringsgrader mot den anvendte rMLA-konsentrasjon kunne man ved hjelp av ikke-lineær regresjon fastslå den proteinkonsentrasjon som førte til 50% inhibering av translasjonsaktiviteten sammenlignet med kontrollsatsen. Denne IC_{50} -verdi utgjør en system-avhengig størrelse som muliggjør en påvisning og en kvantifisering av den enzymatiske aktivitet av rMLA (oppløselig), rMLA (tilbakefoldet) sammenlignet med nMLA (figur 9).

Figur 9 viser påvisningen av den enzymatiske, ribosom-inaktiverende aktivitet for den rekombinante MLA-kjede, hvorved det både ved isolering av den oppløselige ekspresjonsproduksandel (rMLA oppløselig) som fra den ved tilbakefolding av det fra "inclusion bodies" isolerte produkt (rMLA tilbakefoldet) oppnås enzymatisk aktivt ekspresjonsprodukt. rMLA (oppløselig) og rMLA (tilbakefoldet) oppviser overensstemmende aktiviteter med IC_{50} -verdier på $10,7 \pm 1,3$ pM henholdsvis $15,6 \pm 6,6$ pM. De oppviser derved en lavere toksisk aktivitet enn den naturlige MLA-kjede (IC_{50} $1,1 \pm 0,7$ pM).

Eksempel 10

Karbohydrat-bindende aktivitet for mistellectin-B-kjeden

- Påvisningen av den karbohydrat-bindende aktivitet for den rekombinante mistellectin-B-kjede samt sammenligningen mellom karbohydrat-bindende aktiviteter og spesifisiteter for rekombinant og vegetabilsk mistellectin-B-kjede skjedde ved "Enzyme-Linked-Lectin-Assay" (ELLA) i nærvær av kompeterende karbohydrater. Bindingen av nMLB- og rMLB-kjeden skjedde under anvendelse av en immobilisert asialofetuin-matriks på særlig galaktose- og N-acetyl-galaktosamin-rester samt under anvendelse av en immobilisert fetuin-matriks på hovedsakelig sialinsyrerester.

For immobilisering av en karbohydratmatriks ble 100 µl av en oppløsning av 1,1 mg asialofetuin (Sigma, Deisenhofen) henholdsvis 1,1 mg fetuin (Sigma, Deisenhofen) i 11 ml PBS bragt til kaviteter i MaxiSorp C96 mikrotiterplater (Nunc, Wiesbaden) og inkubert i 16 timer ved romtemperatur. etter vasking av mikrotiterplatene med 3 x 150 µl/kavitet PBS-T (10 mM natriumfosfatbuffer, 130 mM NaCl, 0,1 volum-% Tween® 20, pH 7,2) ble mikrotiterplaten inkubert i 1 time ved 36°C for å blokkere ikke-spesifikke bindingssteder med 200 µl/kavitet PBS-T-1% BSA (10 mM natriumfosfatbuffer, 120 mM NaCl, 0,1 volum-% Tween® 20, 1% vekt/volum BSA, pH 7,2) og derefter vasket igjen som beskrevet. For testen anvendte man 100 µl B-kjede-
 10 holdige preparater i en konsentrasjon av 100-500 ng/ml, fortrinnsvis 400 ng/ml, hvorved testkonsentrasjonen ble innstilt ved prøvefortynning i PBS-0,05% BSA (10 mM natriumfosfatbuffer, 130 mM NaCl, 0,05% vekt/volum BSA, pH 7,2). Pr. testkonsentrasjon og kontroll la man opp til 2-3 replikas. Bestemmelsen av tomverdiene skjedde med PBS-0,05% BSA eller den angjeldende preparatbuffer. For bestemmelse av
 15 bindingsspesifisitetene skjedde prøveinkuberingen i fravær av fritt, kompeterende sukker. For å fortrenge rMLB, nMLB eller ML-holoproteiner fra bindingen til asialofetuin- henholdsvis fetuin-matriksen ble det tilsatt galaktose, fortrinnsvis i konsentrasjonsområdet 0-280 mM, N-acetyl-galaktosamin i konsentrasjonsområdet 0-280 mM, laktose i konsentrasjonsområdet 0-140 mM eller sialinsyre i
 20 konsentrasjonsområdet 0-140 mM.

Platene ble etter oppfylling inkubert i 2 timer ved 36°C og derefter vasket som beskrevet. Til de fylte kaviteter ble det satt 100 µl/kavitet anti-mistlelectin serum fra geit (1:19800-fortynning av serumforrådet i PBS-T-0,1% BSA-Tx (10 mM
 25 natriumfosfatbuffer, 120 mM NaCl, 0,1 volum-% Tween® 20, 0,1% vekt/volum BSA, 1 volum-% Triton® X100, pH 7,2)), hvorefter man inkuberte i 2 timer ved 36°C og så vasket som beskrevet ovenfor. For påvisning av immunkomplekset ble det pr. fylt kavitet satt 100 µl anti-geite IgG-IgG, konjugert med pepperrotperoksydase (Sigma, Deisenhofen) i en 1:3500-fortynning i PBS-1% BSA (10 mM natriumfosfatbuffer, 130
 30 mM NaCl, 1% vekt/volum BSA, pH 7,2) og inkubert i 1 timer ved 36°C. Kavitene ble derefter vasket seks ganger med 150 µl/kavitet PBS-T. For fremkalling tilsatte man 100 µl/kavitet substratoppløsning (1 o-fenylendiamintablett (Sigma, Deisenhofen) i 25 ml 65 mM sitronsyre, pH 5,0 + 10 µl 30% hydrogenperoksyd) og det hele ble inkubert i 20 minutter ved romtemperatur og i mørke. Reaksjonsstansingen skjedde ved tilsetning av
 35 100 µl/1M svovelsyre/kavitet. Bestemmelsen skjedde ved absorpsjonsmåling ved 450 nm med en referansebølgelengde på 690 nm og beregning av IC₅₀-verdiene ved beskrivelse av de oppnådde måledata ved hjelp av 4-parameter-fit.

Figur 10 viser oppføringen av den i ELLA-systemet observerte fortregning av rMLB og nMLB fra immobiliserte asialofetuinligander ved stigende mengder D-galaktose (figur 10a), β -galaktose (figur 10b) eller N-acetyl-galaktosamin (figur 10c) samt fortregningen av immobiliserte fetuinligander ved stigende mengde sialinsyre (figur 10d). Bindingskarakteristika for nMLB og rMLB beskrives ved IC_{50} -verdien tilsvarende den halvmaksimale fortregning.

Mens karbohydratbindingen for den vegetabiliske nMLB-kjede i første linje kan kompeteres ved galaktose ($IC_{50} = 4,5$ mM) og β -laktose ($IC_{50} = 4,9$ mM), viser den rekombinante rMLB-kjede helt overraskende en tydelig forandret karbohydrat-spesifisitet. I motsetning til nMLB er karbohydrat-bindeaktiviteten for rMLB ikke kompetierbar ved galaktose (IC_{50} ikke bestemmbar) og kun i liten grad kompetierbar ved β -laktose ($IC_{50} > 70$ mM). Ved siden av den drastisk reduserte affinitet i forhold til galaktose og β -laktose oppviser den rekombinante rMLB-kjede dog en tydelig spesifisitet for N-acetyl-galaktosamin (IC_{50} 109 mM). En ytterligere for nMLB beskrevet aktivitet ved binding til sialinsyreligander kunne også påvises for den rekombinante MLB-kjede (figur 10d). Herved viser det seg overensstemmende bindingsaffiniteter for den vegetabiliske nMLB-kjede ($IC_{50} = 49,8$ mM) og den rekombinante rMLB-kjede ($IC_{50} = 47,1$ mM).

Overfor den vegetabiliske, i første linje galaktose/ β -laktose-spesifikke nMLB-kjede har den rekombinant-fremstilte rMLB-kjede en klart forskjellig og mot N-acetyl-galaktosamid/sialinsyre-bindingen forskjøvet karbohydrat-spesifisitet.

Eksempel 11

Bestemmelse av cytotoxissiteten in vitro for reassosierte mL-holoproteiner på humane, lymfatiske leukemiceller

Integriteten for mistellectin-holoproteinet ble påvist ved den kvantitative bestemmelse av cytotoxissiteten overfor den humane, mononukleære (lymfatiske) leukemicellelinje MOLT-4 (European Collection of Animal Cell Cultures No. 85011413).

MOLT-4-celler ble dyrket i serumfritt MDC-1-medium (PAN SYSTEMS, Aidenbach) og for testen innstilt til en innsåingscelledensitet på $1,6 \times 10^5$ MOLT-4-celler/ml ved en levedyktighet $>98\%$. For bestemmelse av cytotoxissiteten bragte man inn pr. kavitet på 96-hulls mikrotiterplate, 90 μ l av en MOLT-4-cellesuspensjon tilsvarende 18 000

celler/kavitet og dertil ble det satt 10 µl prøveoppløsning. For testen ble det anvendt mistellectin-holoproteinpreparater (charge #220793 (Madaus) og BRAIN 12/94, som ble isolert fra mistelblad eller mistelte ved en standardmetode på laktosyl-sepharose (Franz et al., 1977)) som in vitro reassosierte rML-holoprotein i konsentrasjonsområdet 1-100 pg/ml tilsvarende (1,6 fM - 1,66 pM), hvorved fortynningsrekkene i MDC-1-cellekultur-medium ble opprettet. Pr. prøvekonsentrasjon og kontroll ble det satt opp 6 replikaer.

Cellene ble inkubert i 72 timer ved 37°C og 5% CO₂ i gassbehandlede inkuberingskap. Kvantifisering av de cytotoksiske effekter skjedde ved bestemmelse av leveyktigheten for cellene ved hjelp av et oppløselig formazan-farvestoff i henhold til WST-1-metoden (Scudiero et al., 1988) under anvendelse av tilsvarende celleprolifereringsreagens WST-1 (Boehringer Mannheim).

Det rekombinante holoprotein og også det kimære holoproteinet rMLB/nMLA viste med henblikk på MOLT-4-cytotoksisiteten, en biologisk aktivitet med IC₅₀-verdier rundt 10-30 pg/ml, noe som var i overensstemmelse med det naturlige protein. Derimot viste rMLB ingen cytotoksisk aktivitet i det prøvede konsentrasjonsområde (rMLB til 1 ng/ml).

Eksempel 12

Induksjon av apoptose på eksemplet med human monocytcellerlinjen U937 ved rekombinant mistellectin (rML)

Påvisningen av induksjonen av apoptotiske prosesser på grunn av rekombinant mistellectin (rMLA/rMLB) skjedde her ved farving av cellekjernen med fluorescensfarvestoffet DAPI (Hotz et al. 1992). De typiske apoptotiske forandringer i kjerne-morfologien kunne derved gjøres synlige i mikroskopet og kvantifisering ved uttelling av 500-1000 celler/prøve. Anvendelsen av serumfritt medium er av betydning for analysenes sensitivitet, da nærværet av serumproteiner drastisk reduserer den tilgjengelige mengde av lectin (med ca. en faktor 40 ved 10% FCS, Ribereau-Gayon et al., 1995). Induksjonstiden på 24 timer tillater kun i betinget grad en direkte korrelasjon med MOLT-analysen, da den cytotoksiske effektive viabilitetsanalysen først er fullstendig utpreget etter 72 timer, mens apoptosen er en tidlig effekt. Ved for lang inkubasjonstid overdekkes apoptosen av sekundær nekrose.

Figur 12 viser en tydelig forhøyelse av graden av apoptotiske U937-celler etter behandling med rekombinant ML-holoprotein. Ved 70 pg/ml er tallet av apoptotiske celler etter

24 timer i to forskjellige kulturer i serumfritt medium, øket med en faktor 3. Det rekombinante mistellectin har altså på samme måte som det naturlige protein (Janssen et al., 1993) evnen til å indusere den apoptotiske celledød.

5 Eksempel 13

Immunstimulerende virkning av rekombinant mistellectin i PBMC-modellen

Ved cytokinene TNF- α (monocytt, makrofager) og IFN- γ (T-hjelperceller) dreier det seg om sentrale mediatorer innen det komplekse nettverket av det menneskelige
10 immunsystem.

Humane, mononukleære celler (PBMC, inneholder monocytt og lymfocytter) fra sunde blodgivere ble isolert ved hjelp av FICOLL-PAQUE®-densitetsgradiententrifugering i henhold til produsentens instruksjoner (Pharmacia,
15 Sverige).

For induksjonen av frisettingen av TNF- α ble cellene (4×10^6 mononukleære celler/ml) inkubert i RPMI 1640-medium med 10 volum-% føtalt kalveserum, 100 E/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, først i 18 timer med de rekombinante mistellectinkomponenter
20 alene og derefter i ytterligere 24 timer med 1 μ g/ml lipopolysakkarider fra *Salmonella abortus equi* som kostimulerende faktor ved 37°C, 5% CO₂ og >95% relativ fuktighet i U-formede mikrotiter-cellekulturplater i et gassbehandlingsinkuberingsapparat. Derefter ble konsentrasjonen av TNF- α kvantifisert umiddelbart i de cellefrie supernatanter ved hjelp av ELISA (Genzyme Diagnostics, Rüsselsheim) for induksjonen av frisettingen av
25 IFN- γ ble cellene i det ovenfor nevnte medium først inkubert 1 time med det rekombinante mistellectin alene og derefter i ytterligere 65 timer med 0,5 μ g/ml fytohemagglutinin-L som kostimulerende faktor som beskrevet. Derefter ble konsentrasjonen av IFN- γ kvantifisert i de cellefrie supernatanter ved hjelp av ELISA (ENDOGEN INC., Cambridge, USA).

30

Eksempel 14

Immunstimulerende virkning av rekombinant mistellectin i skin²-ZK1200-modellen

35 Den som bioanalyse etablerte skin²-modell består av en tredimensjonal, fibroblastholdig dermis og en strukturert epidermis av ikke-forhornede keratinocytter i deres egne, naturlig utskilte matriks (Joller et al., 1996). Hudvevstykkene (11 x 11 mm², fremstilt

fra humane, primære celler; Advanced Tissue Sciences Inc. (ATS), La Jolla, USA) ble bragt på et nylonvevgitter i agarose og overført til spesialmedium A (ATS, La Jolla, USA) umiddelbart etter levering. Både IL-1 α og IL-6 er relevante, stimulerende cytokiner for det menneskelige immunsystem.

5

For induksjonen av frisettingen av IL-1 α henholdsvis IL-6 ble skin²-vevstykkene inkubert med prøvesubstansen i 2 ml av spesialmedium B (ATS, La Jolla, USA) i 24 timer ved 37°C, 5% CO₂ i luft og > 95% relativ fuktighet i 12-hulls cellekulturplater (Corning Glass Works, Corning, USA). I de cellefrie supernatanter målte man så, ved
10 hjelp av ELISA, konsentrasjonen av IL-1 α (kvantikin human IL-1 α -analyse, R&D Systems Inc., Minneapolis, USA) henholdsvis IL-6 (h-interleukin 6 ELISA, Boehringer Mannheim GmbH).

I skin²-modellen viste det seg en dosisavhengig og av 0,25-8 ng rML/ml induert frisetting av IL-1 α samt en dosisavhengig og av 0,5-8 ng rML/ml induert frisetting av IL-
15 6 (figur 14). Med den rekombinante rMLB-kjede alene kunne det overraskende nok ikke indueres noen av de ovenfor nevnte cytokinfrisettinger, noe som er i motsetning til dagens kjente teknikk i henhold til hvilken den immunstimulerende aktivitet hovedsakelig føres tilbake til lectinaktiviteten av B-kjeden (Hajto et al., 1990).

20

Eksempel 15

Aktivering av immunkompetente celler ved rekombinant mistellectin-B-kjede (rMLB)

25 Aktiveringen av immunkompetente celler ble undersøkt ved hjelp av induksjonen av celleoverflateprotein CD69. CD69 viser seg som et av de første celleoverflate-antigener etter aktivering av T-cellene, B-cellen og særlig av "Natural Killer"-cellene (NK-cellene) som har en sentral betydning ved det naturlig tumorforsvar på grunn av deres evne til å erkjenne neoplastiske celler og til å lysere. CD69 utgjør en aktiverings-
30 markør for den ovenfor nevnte immunkompetente cellepopulasjon, da celleoverflateprotein ikke uttrykkes på hvilende lymfocytter. I tillegg kunne man for det induserbare CD69-overflateprotein påvise en fremmede funksjon for den cytolytiske aktivitet av NK-cellene og TcR γ / δ -T-cellen (Moretta et al., 1991).

35 For påvisning av overflatemarkøren på humane, mononukleære celler ved Flow-cytometri (FACS) ble PBMC isolert ved hjelp av en densitetsgradient på Hypaque (Sigma) på samme måte som i eksempel 13. etter opptak av cellene i RPMI 160-

medium med 5% FCS og innsåing av ca. 250 000 celler/brønn i en mikrotiterplate
skjedde det en 4 timers inkubering med 1, 10, 30 og 100 ng av testsubstansen rMLB. 20
minutters inkuberingen med fluorescens-markert anti-CD69 MAK i isbad ble fulgt av en
vasking i Hanks oppløsning med 5% FCS. De sedimenterte, merkede celler ble tatt opp i
5 200 µl "Sheath Fluid" og målt i FACScan (Becton Dickinson). Oppført er den midlere
fluorescens tilsvarende antallet CD69-celleoverflatemarkør/celle samt andelen CD69-
positive celler i celle-totalpopulasjonen.

I konsentrasjonsområdet 1-100 ng/ml kunne man fastslå en aktivering av de mono-
10 nukleære celler både hva angår opptreden av CD69 på celleoverflaten som hva angår
CD69-positive celler. Det viste seg herved en klokkeformet dosisavhengighetskurve. En
cytotoksisk virkning på de her undersøkte PBMC kunne ikke påvises, ikke engang ved
de høyeste konsentrasjoner av 100 ng/ml rMLB.

Litteratur:

- Babbitt, P.C., West, B.L., Buechter, D.D., Kuntz, I.D. og Kenyon, G.L. (1990):
 "Removal of a proteolytic activity associated with aggregates formed from
 expression of creatine kinase in *Escherichia coli* leads to improved recovery of
 5 active enzyme.", "Bio/Technology", **8**, 945-949.
- Baur, A., Buschinger, A. og Zimmermann, F.K. (1993); "Molecular cloning and
 sequencing of 18S rDNA fragments of six different ant species.", "Ins. Soc.", **40**,
 325-335.
- 10 Beuth, J., Ko, H.L., Gabius, H.-J. og Pulverer, G. (1991): "Influence of treatment with
 the immunomodulatory effective dose of the β -galactoside-specific lectin from
 Mistletoe on tumor colonization in BALB/c-mice for two experimental model
 systems in vivo", **5**, 29-32.
- 15 Beuth, J., Ko, H.L., Gabius, H.-J., Burrichter, H., Oette, K og Pulverer, G. (1992):
 "Behavior of lymphocyte subsets and expression of activation markers in
 response to immunotherapy with galactoside-specific lectin from mistletoe in
 breast cancer patients.", "Clin Investig.", **70**, 658-661.
- 20 Beuth, J., Ko, H.L., Tunggal, L., Steuer, M.K., Geisel, J. Jeljaszewicz, J. og Pulverer,
 G. (1993): "Thymocyte proliferation and maturation in response to galactoside-
 specific Mistletoe Lectin-1 in vivo", **7**, 407-410.
- 25 Beuth, J., Ko, H.L., Tunggal, L., Geisel, J. og Pulverer, G. (1993): "Vergleichende
 Untersuchungen zur immunaktiven Wirkung von Galactosid-spezifischem
 Mistellektin.", "Arzneim. Forsch.", **43**, 166-169.
- Bocci, V. (1993): "Mistletoe (*Viscum album*) lectins as cytokine inducers and
 30 immunoadjuvant in tumor therapy.", "J. of Biological Regulators and
 Homeostatic Agents", **7**, 1-6.
- Beuth, J., Ko, H.L., Tunggal, L., Buss, G., Jeljaszewicz, J., Steuer, M.K. og Pulverer, G.
 (1994): "Immunaktive Wirkung von Mistellektin-1 in Abhängigkeit von der
 35 Dosierung.", "Arzneim. Forschung", **44**, 1255-1258.

- Bradford, M.M. (1976): "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.", "Analytical Biochemistry", **72**, 248-254.
- 5 Dietrich, J.B., Ribéreau-Gayon, G., Jung, M.L., Franz, H., Beck, J.P. og Anton, R. (1992): "Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins.", "Anti-Cancer Drugs", **3**, 507-511.
- 10 Eifler, R., Pfüller, K., Göckeritz, W. og Püller, U. (1994): "Improved procedures for isolation and standardization of mistletoe lectins and their subunits: implications for the analysis of lectin pattern of the european mistletoe." i "Lectins Biology-Biochemistry Clinical Biochemistry" (Bog-Hansen, Hrsg.), vol 9, M/S Wiley, New Delhi.
- 15 Endo, Y., Tsurugi, K. og Franz, H. (1988a): "The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein.", "FEBS Lett.", **231**, 378-80.
- 20 Erlich, H.A., Gelfand, D.H. og Saiki, R.K. (1988): "Specific DNA amplification.", "Nature", **331**, 461.
- Franz, H., Haustein, B., Luther, P., Kuropka, U. og Kindt, A. (1977): "Isolierung und Charakterisierung von Inhaltsstoffen der Mistel (*Viscum album* L.) I. Affinitätschromatographie an fixierten Plasmaproteinen.", "Acta Bio. Med. Germ.", **36**, 113-117.
- 25
- Frohman, M.A., Dush, M.K. og Martin, G.R. (1988): "Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: Amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer.", "Proc. Natl. Acad. Sci. USA", **85**, 8998-9002.
- 30
- Gabius, H.-J., Walzel, H., Joshi, S.S., Kruip, J., Kojima, S., Gerke, V., Kratzin, H. og Gabius, S. (1992): "The immunomodulatory β -galactoside-specific lectin from Mistletoe: Partial sequence analysis, cell and tissue binding, and impact on intracellular biosignalling of monocytic leukemia cells.", "Anticancer Res.", **12**, 669-676.
- 35

- Gabius, H.-J., Gabius, S., Joshi, S.S, Koch, B., Schroeder, M., Manzke, W.M. og Westerhausen, M. (1993): "From III-defined extracts to the immunomodulatory lectin: Will there be a reason for oncological application of Mistletoe?", "Planta Med.", **60**, 2-7.
- 5 Gabius, H.-J., Gabius, S. (1994): "Die Misteltherapie auf dem naturwissenschaftlichen Prüfstand", "PZ", **139**, 9-16.
- Ganguly, C. og Das, S. (1994): Plant Lectins as inhibitors of tumor growth and
10 modulators of host immune response.", "Chemotherapy", **40**, 272-278.
- Garcia-Olmedo, F., Carbonero, P., Hernandez-Lucas, C., Paz-Ares, J., Ponz, F., Vicente, O. og Sierra, J.M. (1983): "Inhibition of eukaryotic cell-free protein synthesis by thionins from Wheat endosperm.", "Biochim. Biophys. Acta", **740**, 52-56.
- 15 Gribskov, M., Devereuz, J. og Burgess, R. (1984): "Nucl. Acids Res.", **12**, 539-549.
- Hajto, T. (1986): "Immunomodulatory effects of Iscador: A Viscum album preparation.", "Oncology", **43**, suppl. 1, 51-65.
- 20 Hajto, T., Hostanska, K. og Gabius, H.-J. (1989): "Modulatory potency of the β -galactoside-specific lectin from Mistletoe extraxt (Iscador) on the host defense system in vivo in Rabbits and Patients.", "Cancer Res.", **49**, 4803-4808.
- 25 Hajto, T., Hostanska, K., Frei, K., Rordorf, C. og Gabius, H.-J. (1990): "Increased secretion of Tumor necrosis factor α , Interleukin 1 and Interleukin 6 by Human Mononuclear Cells exposed to β -Galactoside-specific lectin from clinically applied Mistletoe extraxt.", "Cancer Res.", **50**, 3322-3326.
- 30 Harlowe, E. og Spur, D. (1988): i "Antibodies". "A laboratory manual.", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- Heiny, B.-M. og Beuth, J. (1994): "Mistletoe extract standardized for the galactoside-specific lectin (ML-1) induces β -endorphin release and immunopotential in
35 breast cancer patients.", "Anticancer Research", **14**, 1339-1342.

- Hotz, M., Del Bino, G., Lassota, P., Traganos, F., Darzynkiewicz, Z. (1992): "Cytostatic and cytotoxic effects of fostriecin on human promyelocytic HL-60 and lymphocytic MOLT-4 leukemic cells.", "Cancer Res.", **52**, 1530-1535.
- 5 Hülsen, H., Doser, C og e, F. (1986): "Differences in the in vitro effectiveness of preparations produced from Mistletoes of various host trees.", *Drug. Res.*, **36**, 433-436.
- Jäggy, C., Musielski, H., Urech, K. og Schaller, G. (1995): Quantitative Determination
10 of lectin in Mistletoe preparations.", "Arzneim.-Forsch./Drug Res." **45**, 905-909.
- Janssen, O., Scheffler, A. og Kabelitz, D. (1993): "In vitro Effects of Mistletoe Extracts and Mistletoe Lectins. Cytotoxicity towards tumor cells due to the induction of programmed cell death (apoptosis).", "Arzneim. Forsch.", **43**, 1221-1227.
- 15 Joller, P.W., Menrad, J.M., Schwarz, T., Pfüller, U., Parnham, M.L., Weyhenmeyer, R. og Lentzen, H. (1996): "Stimulation of cytokine production via a special standardized Mistletoe preparation in an in vitro skin bioassay.", "Arzneim. Forsch./Drug Res.", **46**, 649-653.
- 20 Katzin, B.J., Collins, E.J. og Robertus, J.D. (1991): "Structure of Ricin A-Chain at 2,5 Å.", "Proteins", **10**, 251-259.
- Kim, Y., Misna, D., Monzingo, A.F., Ready, M.P., Frankel, A. og Robertus, J.D.
25 (1992): "Structure of a Ricin mutant showing rescue of activity by a noncatalytic residue.", "Biochemistry", **31**, 3294-3296.
- Lord, J.M., Roberts, L.M. og Robertus, J.D. (1994): "Ricin: structure, mode of action, and some current applications", "FASEB J.", **8**, 201-208.
- 30 Männel, D.N., Becker, H., Gundt, A., Kist, A. og Franz, H. (1991): "Induction of tumor necrosis factor expression by a lectin from *Viscum album*.", "Cancer Immunol. Immunother.", **33**, 177-182.
- 35 Minowada, J., Ohuma, T., Moore, G.E. (1972): "Rosette-forming human lymphoid cell lines.", "J. Nat. Cancer Inst.", **49**, 891-895.

- Mendez, E., Moreno, A., Colilla, F., Pelaez, F., Limas, G.G., Mendez, R., Soriano, F., Salinas, M. og de Haro, C. (1990): "Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, g-hordothionin, from barley endosperm.", "Eur. J. Biochem.", **194**, 533-539.
- 5 Moretta, A. et al. (1991): "J. Exp. Med.", **172**, 701-707.
- Ribereau-Gayon, G., Jung, M.-L., Beck, J.-P., Anton, R. (1995): "Effect of fetal calf serum on the cytotoxicactivity of Mistletoe (*Viscum album* L.) lectins in cell culture.", "Phytotherapy Res.", **9**, 336-339.
- 10 Rutenber, E. og Robertus, J.D. (1991): "Structure of Ricin B-chain at 2,5 Å resolution.", "Proteins", **10**, 260-269.
- 15 Scudiero, P.A. et al. (1988): "Cancer Res.", **48**, 4827-4823.
- Stein, G. og Berg, P.A. (1994): "Non-lectin component in a fermented extract from *Viscum album* L. grown on pines induces proliferation of lymphocytes from healthy and allergic individuals in vitro.", "Eur. J. Clin. Pharmacol.", **47**, 33-38.
- 20 Stirpe, F., Barbieri, L., Battelli, M.G., Soria, M. og Lappi, D.A. (1992): "Ribosome-inactivating proteins from plants: Present status and future prospects.", "Bio/Technology", **10**, 405-412.
- 25 Studier, F.W. og Moffart, B.A. (1986): "Use of Bacteriophage T7 RNA Polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes.", "J. Mol. Biol.", **189**, 113-130.
- Tonevitsky, A.G., Rakhmanova, V.A., Agapov, I.I., Shamshiev, A.T., Usacheva, E.A., Prokoph'ev, S.A., Denisenko, O.N., Alekseev, Y. og Pfueller, U. (1995): The interactions of anti-MLI monoclonal antibodies with isoforms of the lectin from *Viscum album*.", "Immunol. Lett.", **44**, 31-4.
- 30 Witetta, E.S., Thorpe, p.E., Uhr, J.W. (1993): "Immunotoxins: magic bullets or misguided missiles?", "Immunol. Today", **14**, 252-259.
- 35

Weston, S.A., Tucker, A.D., Thatcher, D.R., Derbyshire, D.J. og Pauptit, R.A. (1994):
"X-ray structure of rekombinant Ricin A-chain at 1,8 Å resolution.", "J. Mol.
biol.", **244**, 410-422.

P a t e n t k r a v

1.
Nukleinsyremolekyl, k a r a k t e r i s e r t v e d a t
 - 5 (a) koder et preproprotein som etter modning oppviser den biologiske funksjon til mistellektindimeren og oppviser den i figur 4c viste nukleinsyresekvens;
 - (b) koder et fragment av preproproteinet ifølge (a), hvorved fragmentet naturlig er en biologisk aktiv bestanddel av mistellektindimeren;
 - (c) skiller seg fra nukleinsyremolekylet ifølge (a) eller (b) ved degenerering av den
 - 10 genetiske kode; eller
 - (d) hybridiserer under stringente betingelser med nukleinsyremolekylet ifølge (a), (b) eller (c) og koder et polypeptid med den under (a) eller (b) angitte, biologiske funksjon.
- 15 2.
Nukleinsyremolekyl ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t fragmentet er A-kjeden av mistellectin som er kodet ved den i figur 4a viste nukleotidsekvens.
- 20 3.
Nukleinsyremolekyl ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d a t fragmentet er B-kjeden av mistellectin som er kodet ved den i figur 4b viste nukleotidsekvens.
- 25 4.
Nukleinsyremolekyl ifølge ett av kravene 1 til 3, k a r a k t e r i - s e r t v e d a t det er et DNA-molekyl.
5.
30 Nukleinsyremolekyl ifølge ett av kravene 1 til 3, k a r a k t e r i - s e r t v e d a t det er et RNA-molekyl.
6.
Vektor, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den inneholder minst et
 - 35 nukleinsyremolekyl i henhold til ett av kravene 1 til 4.

7.

Vektor ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder både et nukleinsyremolekyl ifølge krav 2 eller 4 og et nukleinsyremolekyl ifølge krav 3 eller 4.

5

8.

Vektor ifølge krav 6 eller 7, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en ekspresjonsvektor.

10 9.

Vert, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er transformert med minst en vektor i henhold til ett av kravene 6 til 8, der den transformerte vert ikke er human, ikke en transgen dyreart, ikke en transgen plante og ikke en transgen plantesort.

15 10.

Vert ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en plantecelle.

11.

20 Vert ifølge krav 9, k a r a k t e r i s e r t v e d at den er en pattedyr-celle, en bakterie, en sopp-celle, en gjær-celle eller en insekt-celle.

12.

Vert ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d at bakterien er
25 E. coli, sopp-cellen er en Aspergillus-celle og insekt-cellen er en Spodoptera-celle, fortrinnsvis en Spodoptera frugiperda-celle.

13.

Polypeptid, k a r a k t e r i s e r t v e d at det kodes av
30 nukleinsyremolekylet i henhold til ett av kravene 1 til 5 og produseres av verten i henhold til ett av kravene 11 eller 12, eller som kodes av vektoren ifølge et hvilket som helst av kravene 6 til 8 og fremstilles av verten ifølge krav 11 eller 12 eller som produseres av verten ifølge krav 11 eller 12.

14.

Polypeptid ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d at det oppviser minst en kjemisk eller enzymatisk modifisering hvorved den enzymatiske modifisering ikke er en glykosylering som forekommer i Viscum-albumin.

5

15.

Polypeptid ifølge krav 13 eller 14, k a r a k t e r i s e r t v e d at det er et fusjonsprotein.

10 16.

Polypeptiddimer, k a r a k t e r i s e r t v e d at den har den biologiske funksjon til mistellectin, hvorved den ene monomer kodes av nukleinsyre-molekylet ifølge ett av kravene 2, 4 eller 5 og den andre monomer kodes av nukleinsyre-molekylet ifølge ett av kravene 3 til 5, idet minst en av monomerene produseres av
15 verten i henhold til krav 11 eller 12.

17.

Polypeptiddimer med biologisk funksjon som mistellectin, k a r a k -
t e r i s e r t v e d at den ene monomer kodes av nukleinsyremolekylet
20 ifølge et hvilket som helst av kravene 2, 4 eller 5, og den andre monomeren av
nukleinsyremolekylet ifølge et hvilket som helst av kravene 3 til 5, og der minst en av
monomerene er et polypeptid ifølge krav 14 eller 15.

18.

25 Fremgangsmåte for fremstilling av polypeptidet ifølge krav 13 eller polypeptiddimeren
ifølge krav 16, k a r a k t e r i s e r t v e d at man dyrker verten
i henhold til ett av kravene 9 til 12 under egnede betingelser og isolerer det således
oppnådde polypeptid eller polypeptiddimer.

30 19.

Immuntoksin, k a r a k t e r i s e r t v e d at det omfatter minst
et polypeptid ifølge ett av kravene 13 til 15 eller en polypeptiddimer ifølge krav 16 eller
17.

35 20.

Legemiddel, k a r a k t e r i s e r t v e d at det inneholder
polypeptidet ifølge ett av kravene 13 til 15 og/eller polypeptiddimeren ifølge krav 16

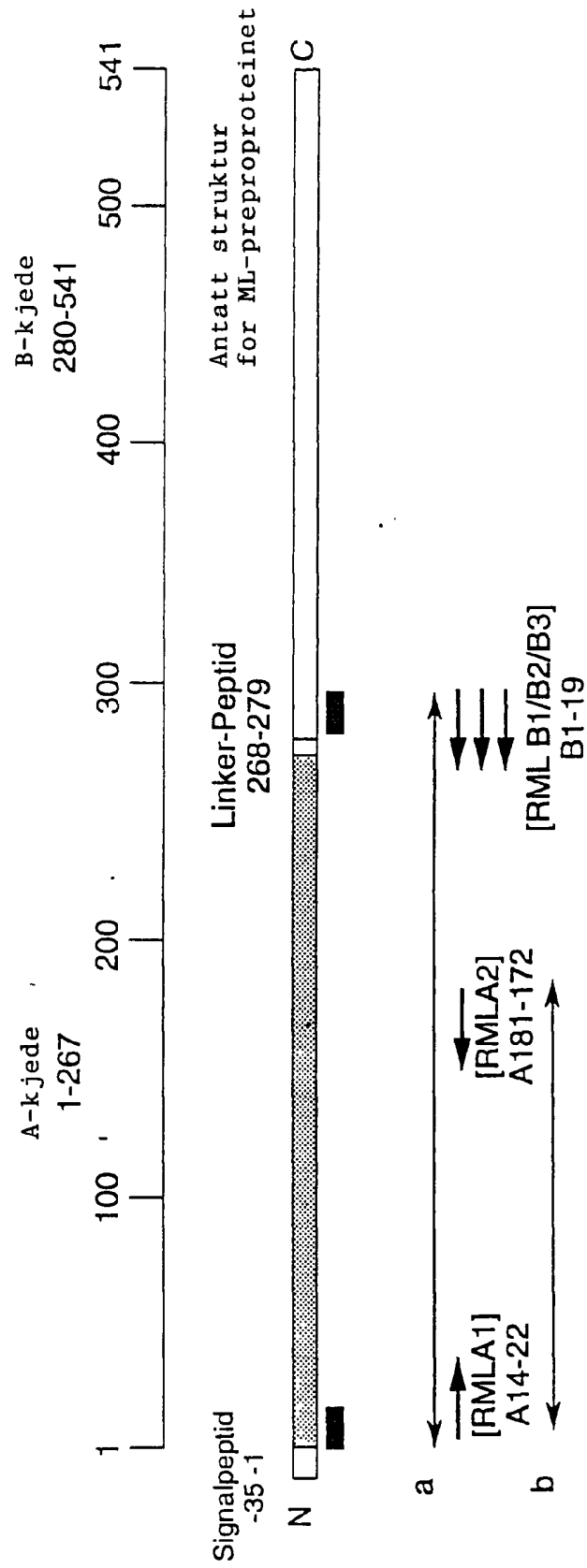
eller 17, og/eller immuntoksinet ifølge krav 19, eventuelt sammen med en farmasøytisk godtagbar bærer.

21.

- 5 Diagnostisk blanding, k a r a k t e r i s e r t v e d at den i det minste inneholder
- (a) et nukleinsyremolekylet ifølge ett av kravene 1 til 5;
 - (b) en primer og/eller et primerpar som spesifikt hybridiserer med nukleinsyremolekylet i a) eller en komplementær tråd av denne; og/eller
 - 10 (c) polypeptidet ifølge ett av kravene 13 til 15 og/eller polypeptiddimeren ifølge krav 16 eller 17.

Fig. 1a

Kloningsstrategi



Konstruksjon av N-terminale A- og B-kjede-oligonukleotider

	H	Q	T	T	G	E	E	Y	F	
GAA	TTC	CAC	CAA	ACI	ACI	GGI	GAA	GAA	TAC	TT
			T	G		G	G	T		

D	D	V	T	S	S	A	E	P	T	V	R	I	V	G	R	N	G	M
GAC	GAC	GTA	ACA	TCA	TCA	GCA	GAA	CCA	ACA	GTA	CGA	ATA	GTA	GGA	CGA	AAC	GGA	ATG
T	T	C	C	C	C	C	G	C	C	C	C	C	C	C	C	T	C	
		G	G	G	G	G		G	G	G	G	T	G	G	G		G	
		T	T	T	T	T		T	T	T	T		T	T	T		T	
				AGC	AGC						AGA				AGA			
				T	T						G							

RML B1	(mLB 1-7)	2304/9216	kombinasjoner
RML B2	(mLB 8-13)	768	kombinasjoner
RML B3	(mLB 14-19)	768	kombinasjoner

Fig 1c

Konstruksjon av det "active site"-oligonukleotid RMLA2

Sekvenssammenligning type-I/II ribosom-inaktiverende proteiner
(A-kjedefragmenter pos. 201-250)

	201		250
T.aestivum	ALYGRTKADK	TSGPKQQQAR	EAVTTLMLV H...EATRFQ TVSGFVAGVL
H.vulgare	ALHGRTKADK	ASGPKQQQAR	EAVTTLMLV N...EATRFQ TVSGFVAGLL
T-santhin	ALDSAITTLF	YYNANSA...	..ASALMVL I QSTSEAAARYK FIEQQIGKRV
Momordin-a	ALDSAITSLI	HYDSTAA...	..AGALLVL I QTTAEAAARFK YIEQQIQERA
Luffin-a	ALDSAITTLF	HYDSTAA...	..AAAFVL I I QTTAEASRFK YIEGQIIERI
Luffin-b	AFDSAITSLF	HYDSTAA...	..AGAFVL I I QTTAEASRFK YIEGQIIERI
Momordin-b	ALSSAITTLF	YYNQSA...	..PSALLVL I QTTAEAAARFK YIERHVAKYV
Ricin	PLEEAIISALY	YYSTGGTQLP	TLARSFII I I OMISEAAARFQ YIEGEMRTRI
RCA	PLEDAISALY	YYSTCGTQIP	TLARSEMVCI OMISEAAARFQ YIEGEMRTRI
Abrin	ALTHAIS...	FLRSGASNDE	EKARTLVI I I QMASEAAARYR YISNRVGVSI
MAP	RENSIVNI.	.YGKAGDV.K	KQAKFFLLAI QMVSEAAARFK YISDKIPSEK
Saporin-2	LLLTFFMEAV.	.NKKARVV.K	NEARFLLIAI QMTAEVARFR YIQNLVTKNF
Saporin-6	LLSTSMEEAV.	.NKKARVV.K	DEARFLLIAI QMTAEAAARFR YIQNLVIKNF
Saporin-3	LLSTLMDAV.	.NKKARVV.K	NEARFLLIAI QMTAEAAARFR YIQNLVTKNF
Dianthin	LLITMIDGV.	.NKKVRVV.K	DEARFLLIAI QMTAEAAARFR YIQNLVTKNF
PAP-S	ILSSDIGKI.	.SGQGSFTEK	IEAKFLLVAI QMVSEAAARFK YIENQVKTNF
CPAP	ILDSNIGKI.	.SGVMSFTEK	TEAEFLLVAI QMVSEAAARFK YIENQVKTNF
a-PAP	ILNSGIGKI.	.YGVDSFTEK	TEAEFLLVAI QMVSEAAARFK YIENQVKTNF

Fig 1c , fortsettelse

Konstruksjon av det "active site"-oligonukleotid RMLA2

	167	187	
Sekvenssammenligning for "active site"-regionen (Region rica 167-187) (Posisjonsbetegnelse analogt ricin-strukturen)	SFIICIQMISEAARFQYIEGE	Ricin (RiP-II)	
	TLVILIQMASEAARYRYSNR	Abrin (RiP-II)	
	FLLIAIQMVSEAAARFKYISDK	MAP (RiP-I)	
	FLLIAIQMTAEAAARFRIQNL	Saporin-6 (RiP-I)	
	FLLVAIQMVSEAAARFKYIENQ	PAP (RiP-1)	

Sekvenssammenligning for "active site"-regionen
(Region rica 167-187)
(Posisjonsbetegnelse analogt ricin-strukturen)

Undersøkelse av
kodonmulighetene
(Region rica 172-181)

I	Q	M	I	S	E	A	A	R	F
ATA	CAA	ATG	ATA	TCA	GAA	GCA	GCA	CGA	TTC
C	G		C	C	G	C	C	C	T
T			T	G		G	G	G	
				T		T	T	T	
				AGC				AGA	
				T				G	
			V						
			GTI						
			A						
			GCI						
			T						
			ACI						

Valgt oligonukleotidkonstruksjon med lav degenerasjonsgrad for amplifikasjon

RML A2 (Pos. rica 181-172):

HOOC-	F	R	A	A	E	S	I/V	M	Q	I	-NH2
5'-AT	GGA	TCC	AAA	III	IGC	IGC	CTC	III	IAC	CAT	CTG
	BamH1	G			T			T		G	-3'

Fig. 2

PCR-amplifikasjon av ML-genfragmentet fra kompleks,
genomisk DNA fra *Viscum album*

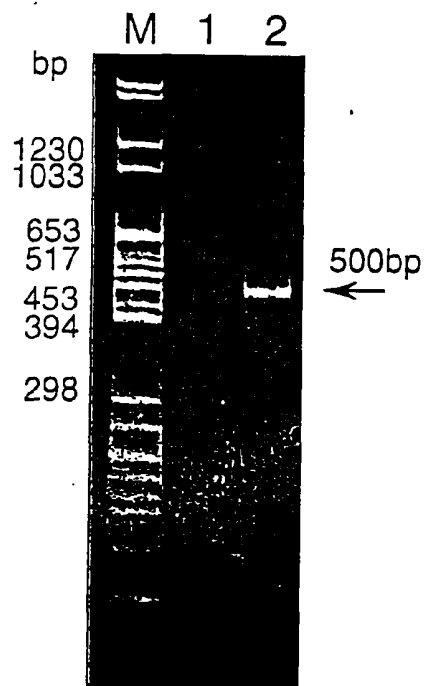


Fig. 3

Kloningsstrategi for rML

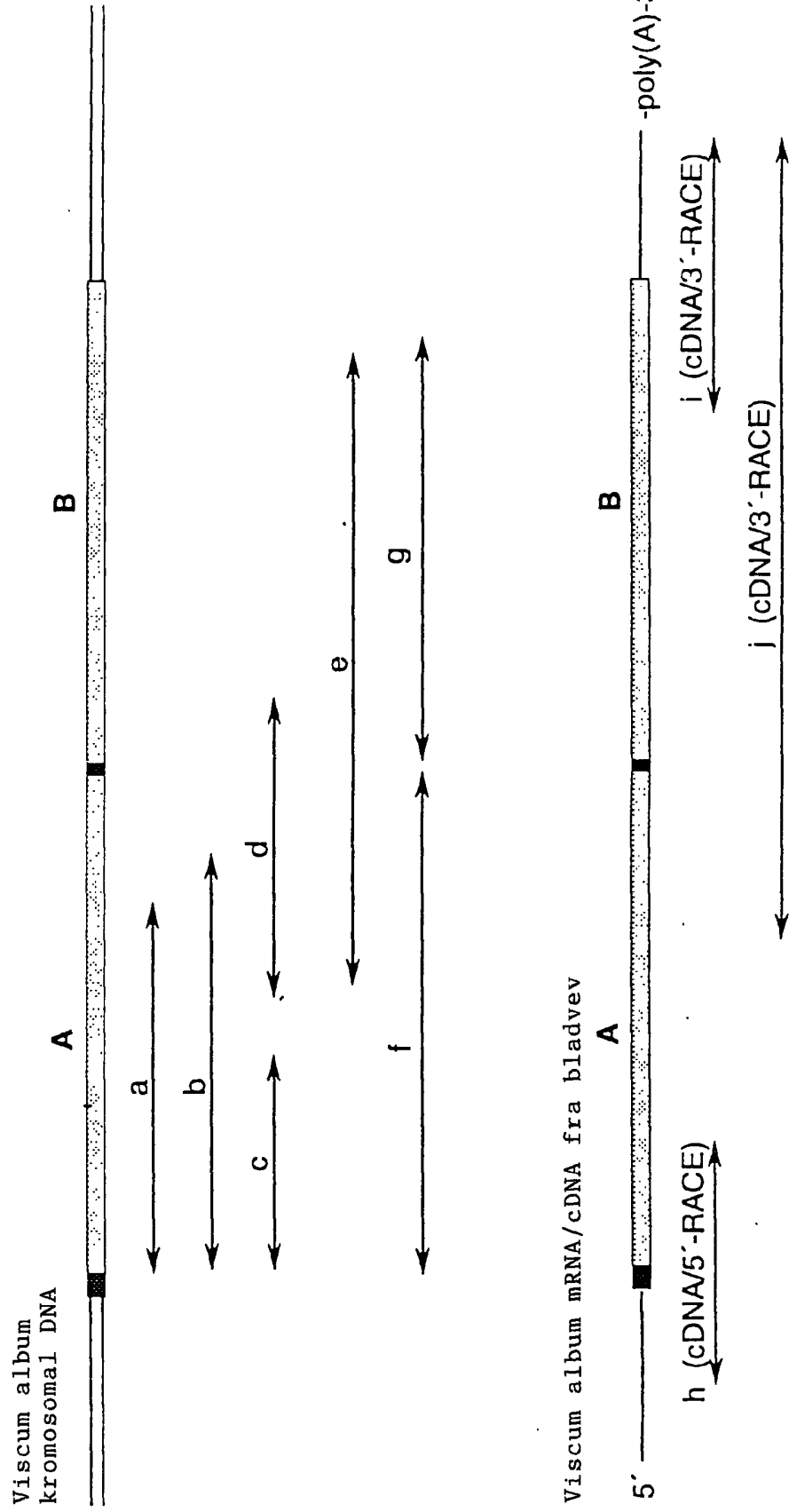


Fig. 4

Rekombinante innskudd av ekspresjonsvektorene
pT7MLA og pT7MLB

a. MLA

```

1/1                               31/11
CAT ATG TAC GAA CGT ATC CGT CTG CGT GTT ACC CAC CAG ACC ACC GGT GAA GAA TAT TTC
Nder Met tyr glu arg ile arg leu arg val thr his gln thr thr gly glu glu tyr phe
61/21                               91/31
CGG TTC ATC ACG CTT CTC CGA GAT TAT GTC TCA AGC GGA AGC TTT TCC AAT CAG ATA CCA
arg phe ile thr leu leu arg asp tyr val ser ser gly ser phe ser asn glu ile pro
121/41                               151/51
CTC TTG CGT CAG TCT ACG ATC CCC GTC TCC GAT GCG CAA AGA TTT GTC TTG GTG GAG CTC
leu leu arg gln ser thr ile pro val ser asp ala gln arg phe val leu val glu leu
181/61                               211/71
ACC AAC CAG GGG GGA GAC TCG ATC ACG GCC GCC ATC GAC GTT ACC AAT CTG TAC GTC GTG
thr asn gln gly gly asp ser ile thr ala ala ile asp val thr asn leu tyr val val
241/81                               271/91
GCT TAC CAA GCA GGC GAC CAA TCC TAC TTT TTG CGC GAC GCA CCA CGC GGC GCG GAA ACG
ala tyr gln ala gly asp gln ser tyr phe leu arg asp ala pro arg gly ala glu thr
301/101                               331/111
CAT CTC TTC ACC GGC ACC ACC CGA TCC TCT CTC CCA TTC AAC GGA AGC TAC CCT GAT CTG
his leu phe thr gly thr thr arg ser ser leu pro phe asn gly ser tyr pro asp leu
361/121                               391/131
GAG CGA TAC GCC GGA CAT AGG GAC CAG ATC CCT CTC GGT ATA GAC CAA CTC ATT CAA TCC
glu arg tyr ala gly his arg asp gln ile pro leu gly ile asp gln leu ile gln ser
421/141                               451/151
GTC ACG GCG CTT CGT TTT CCG GGC GGC AGC ACG CGT ACC CAA GCT CGT TCG ATT TTA ATC
val thr ala leu arg phe pro gly gly ser thr arg thr gln ala arg ser ile leu ile
481/161                               511/171
CTC ATT CAG ATG ATC TCC GAG GCC GCC AGA TTC AAT CCC ATC TTA TGG AGG GCT CGC CAA
leu ile gln met ile ser glu ala ala arg phe asn pro ile leu trp arg ala arg gln
541/181                               571/191
TAC ATT AAC AGT GGG GCG TCA TTT CTG CCA GAC GTG TAC ATG CTG GAG CTG GAG ACG AGT
tyr ile asn ser gly ala ser phe leu pro asp val tyr met leu glu leu glu thr ser
601/201                               631/211
TGG GGC CAA CAA TCC ACG CAA GTC CAG CAT TCA ACC GAT GGC GTT TTT AAT AAC CCA ATT
trp gly gln gln ser thr gln val gln his ser thr asp gly val phe asn asn pro ile
661/221                               691/231
CGG TTG GCT ATA CCC CCC GGT AAC TTC GTG ACG TTG ACC AAT GTT CGC GAC GTG ATC GCC
arg leu ala ile pro pro gly asn phe val thr leu thr asn val arg asp val ile ala
721/241                               751/251
AGC TTG GCG ATC ATG TTG TTT GTA TGC GGA GAG CGG CCA TCT TAA TAG GGA TCC
ser leu ala ile met leu phe val cys gly glu arg pro ser STP STP BamHI

```

Fig. 4

Rekombinante innskudd av ekspresjonsvektorene
pT7MLA og pT7MLB

b. MLB

```

1/1                               31/11
CAT ATG GAT GAT GTT ACC TGC AGT GCT TCG GAA CCT ACG GTG CGG ATT GTG GGT CGA AAT
nder Met asp asp val thr cys ser ala ser glu pro thr val arg ile val gly arg asn
61/21                               91/31
GGC ATG TGC GTG GAC GTC CGA GAT GAC GAT TTC CGC GAT GGA AAT CAG ATA CAG TTG TGG
gly met cys val asp val arg asp asp asp phe arg asp gly asn gln ile gln leu trp
121/41                               151/51
CCC TCC AAG TCC AAC AAT GAT CCG AAT CAG TTG TGG ACG ATC AAA AGG GAT GGA ACC ATT
pro ser lys ser asn asn asp pro asn gln leu trp thr ile lys arg asp gly thr ile
181/61                               211/71
CGA TCC AAT GGC AGC TGC TTG ACC ACG TAT GGC TAT ACT GCT GGC GTC TAT GTG ATG ATC
arg ser asn gly ser cys leu thr thr tyr gly tyr thr ala gly val tyr val met ile
241/81                               271/91
TTC GAC TGT AAT ACT GCT GTG CGG GAG GCC ACT CTT TGG CAG ATA TGG GGC AAT GGG ACC
phe asp cys asn thr ala val arg glu ala thr leu trp gln ile trp gly asn gly thr
301/101                               331/111
ATC ATC AAT CCA AGA TCC AAT CTG GTT TTG GCA GCA TCA TCT GGA ATC AAA GGC ACT ACG
ile ile asn pro arg ser asn leu val leu ala ala ser ser gly ile lys gly thr thr
361/121                               391/131
CTT ACG GTG CAA ACA CTG GAT TAC ACG TTG GGA CAG GGC TGG CTT GCC GGT AAT GAT ACC
leu thr val gln thr leu asp tyr thr leu gly gln gly trp leu ala gly asn asp thr
421/141                               451/151
GCC CCA CGC GAG GTG ACC ATA TAT GGG TTC AGG GAC CTT TGC ATG GAA TCA AAT GGA GGG
ala pro arg glu val thr ile tyr gly phe arg asp leu cys met glu ser asn gly gly
481/161                               511/171
AGT GTG TGG GTG GAG ACG TGC GTG AGT AGC CAA AAG AAC CAA AGA TGG GCT TTG TAC GGG
ser val trp val glu thr cys val ser ser gln lys asn gln arg trp ala leu tyr gly
541/181                               571/191
GAT GGT TCT ATA CGC CC C AAA CAA AAC CAA GAC CAA TGC CTC ACC TGT GGG AG CAC TCC
asp gly ser ile arg pro lys gln asn gln asp gln cys leu thr cys gly arg asp ser
601/201                               631/211
GTT TCA ACA GTA ATC AAT ATA GTT AGC TGC AGC GCT GGA TCG TCT GGG CAG CGA TGG GTG
val ser thr val ile asn ile val ser cys ser ala gly ser ser gly gln arg trp val
661/221                               691/231
TTT ACC AAT GAA GGG GCC ATT TTG AAT TTA AAG AAT GGG TTG GCC ATG GAT GTG GCG CAA
phe thr asn glu gly ala ile leu asn leu lys asn gly leu ala met asp val ala gln
721/241                               751/251
GCA AAT CCA AAG CTC CGC CGA ATA ATC ATC TAT CCT GCC ACA GGA AAA CCA AAT CAA ATG
ala asn pro lys leu arg arg ile ile ile tyr pro ala thr gly lys pro asn gln met
781/261
TGG CTT CCC GTG CCA TGA TAA GGA TCC
trp leu pro val pro STP STP BamHI

```

Fig. 4

9/27

Nukleotidsekvens og avledet aminosyresekvens av
prepromistellectin

C.

```

1/                               31/
TTT TAT CTC CTG CCA TCT TCC ATC GGG GAG TCG CCG TGA CAC CAT TCA GGA ACA ATG AAT
                                         met asn

51/3                               91/13
GCG GTT ATG GAC TCA AGA AGG GCA TGG GCT TCG TGT TTT TTA ATG CTG GGC CTA GTT TTT
ala val met asp ser arg arg ala trp ala ser cys phe leu met leu gly leu val phe
121/23                               151/33
GGT GCG ACG GTC AAA GCG GAA ACC AAA TTC AGC TAC GAG AGG CTA AGA CTC AGA GTT ACG
gly ala thr val lys ala glu thr lys phe ser tyr glu arg leu arg leu arg val thr
181/43                               211/53
CAT CAA ACC ACG GGC GAC GAA TAT TTC CGG TTC ATC ACG CTT CTC CGA GAT TAT GTC TCA
his gln thr thr gly asp glu tyr phe arg phe ile thr leu leu arg asp tyr val ser
241/53                               271/73
AGC GGA AGC TTT TCC AAT GAG ATA CCA CTC TTG CGT CAG TCT ACG ATC CCC GTC TCC GAT
ser gly ser phe ser asn glu ile pro leu leu arg gln ser thr ile pro val ser asp
301/83                               331/93
GCG CAA AGA TTT GTC TTG GTG GAG CTC ACC AAC CAG GGG GGA GAC TCG ATC ACG GCC GCC
ala gln arg phe val leu val glu leu thr asn gln gly gly asp ser ile thr ala ala
361/103                               391/113
ATC GAC GTT ACC AAT CTG TAC GTC GTG GCT TAC CAA GCA GGC GAC CAA TCC TAC TTT TTG
ile asp val thr asn leu tyr val val ala tyr gln ala gly asp gln ser tyr phe leu
421/123                               451/133
CGC GAC GCA CCA CGC GGC GCG GAA ACG CAT CTC TTC ACC GGC ACC ACC CGA TCC TCT CTC
arg asp ala pro arg gly ala glu thr his leu phe thr gly thr thr arg ser ser leu
481/143                               511/153
CCA TTC AAC GGA AGC TAC CCT GAT CTG GAG CGA TAC GCC GGA CAT AGG GAC CAG ATC CCT
pro phe asn gly ser tyr pro asp leu glu arg tyr ala gly his arg asp gln ile pro
541/163                               571/173
CTC GGT ATA GAC CAA CTC ATT CAA TCC GTC ACG GCG CTT CGT TTT CCG GGC GGC AGC ACG
leu gly ile asp gln leu ile gln ser val thr ala leu arg phe pro gly gly ser thr
601/183                               631/193
CGT ACC CAA GCT CGT TCG ATT TTA ATC CTC ATT CAG ATG ATC TCC GAG GCC GCC AGA TTC
arg thr gln ala arg ser ile leu ile leu ile gln met ile ser glu ala ala arg phe
661/203                               691/213
AAT CCC ATC TTA TGG AGG GCT CGC CAA TAC ATT AAC AGT GGG GCG TCA TTT CTG CCA GAC
asn pro ile leu trp arg ala arg gln tyr ile asn ser gly ala ser phe leu pro asp
721/223                               751/233
GTG TAC ATG CTG GAG CTG GAG ACG AGT TGG GGC CAA CAA TCC ACG CAA GTC CAG CAT TCA
val tyr met leu glu leu glu thr ser trp gly gln gln ser thr gln val gln his ser
781/243                               811/253
ACC GAT GGC GTT TTT AAT AAC CCA ATT CGG TTG GCT ATA CCC CCC GGT AAC TTC GTG ACG
thr asp gly val phe asn asn pro ile arg leu ala ile pro pro gly asn phe val thr
841/263                               871/273
TTG ACC AAT GTT CGC GAC GTG ATC GCC AGC TTG GCG ATC ATG TTG TTT GTA TGC GGA GAG
leu thr asn val arg asp val ile ala ser leu ala ile met leu phe val cys gly glu
901/283                               931/293
CGG CCA TCT TCC TCT GAG GTG CGC TAT TGG CCG CTG GTC ATA CGA CCC GTG ATA GCC GAT
arg pro ser ser ser glu val arg tyr trp pro leu val ile arg pro val ile ala asp
961/303                               991/313
GAT GTT ACC TGC AGT GCT TCG GAA CCT ACG GTG CGG ATT GTG GGT CGA AAT GGC ATG TGC
asp val thr cys ser ala ser glu pro thr val arg ile val gly arg asn gly met cys

```

Fig. 4

10/27

Nukleotidsekvens og avledet aminosyresekvens av
prepromistellectin

C. Fortsettelse

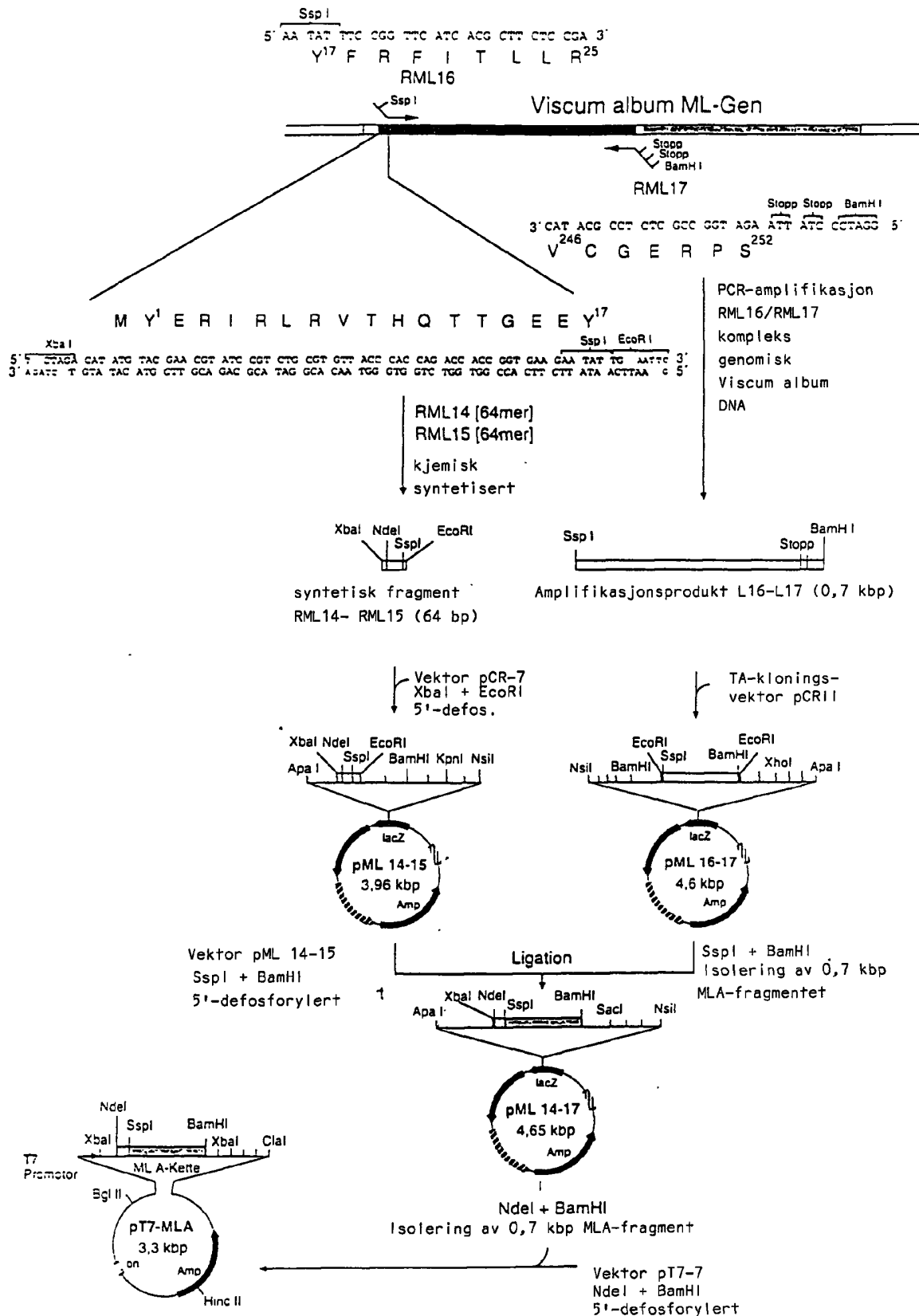
```
1021/323      1051/333
GTG GAC GTC CGA GAT GAC GAT TTC CGC GAT GGA AAT CAG ATA CAG TTG TGG CCC TCC AAG
val asp val arg asp asp asp phe arg asp gly asn gln ile gln leu trp pro ser lys
1031/343      1111/353
TCC AAC AAT GAT CCG AAT CAG TTG TGG ACG ATC AAA AGG GAT GGA ACC ATT CGA TCC AAT
ser asn asn asp pro asn gln leu trp thr ile lys arg asp gly thr ile arg ser asn
1141/363      1171/373
GGC AGC TGC TTG ACC ACG TAT GGC TAT ACT GCT GGC GTC TAT GTG ATG ATC TTC GAC TGT
gly ser cys leu thr thr tyr gly tyr thr ala gly val tyr val met ile phe asp cys
1201/383      1231/393
AAT ACT GCT GTG CGG GAG GCC ACT CTT TGG CAG ATA TGG GGC AAT GGG ACC ATC ATC AAT
asn thr ala val arg glu ala thr leu trp gln ile trp gly asn gly thr ile ile asn
1261/403      1291/413
CCA AGA TCC AAT CTG GTT TTG GCA GCA TCA TCT GGA ATC AAA GGC ACT ACG CTT ACG GTG
pro arg ser asn leu val leu ala ala ser ser gly ile lys gly thr thr leu thr val
1321/423      1351/433
CAA ACA CTG GAT TAC ACG TTG GGA CAG GGC TGG CTT GCC GGT AAT GAT ACC GCC CCA CGC
gln thr leu asp tyr thr leu gly gln gly trp leu ala gly asn asp thr ala pro arg
1381/443      1411/453
GAG GTG ACC ATA TAT GGG TTC AGG GAC CTT TGC ATG GAA TCA AAT GGA GGG AGT GTG TGG
glu val thr ile tyr gly phe arg asp leu cys met glu ser asn gly gly ser val trp
1441/463      1471/473
GTG GAG ACG TGC GTG AGT AGC CAA AAG AAC CAA AGA TGG GCT TTG TAC GGG GAT GGT TCT
val glu thr cys val ser ser gln lys asn gln arg trp ala leu tyr gly asp gly ser
1501/483      1531/493
ATA CGC CCC AAA CAA AAC CAA GAC CAA TGC CTC ACC TGT GGG AGA GAC TCC GTT TCA ACA
ile arg pro lys gln asn gln asp gln cys leu thr cys gly arg asp ser val ser thr
1561/503      1591/513
GTA ATC AAT ATA GTT AGC TGC AGC GCT GGA TCG TCT GGG CAG CGA TGG GTG TTT ACC AAT
val ile asn ile val ser cys ser ala gly ser ser gly gln arg trp val phe thr asn
1621/523      1651/533
GAA GGG GCC AAT TTG AAT TTA AAG AAT GGG TTG GCC ATG GAT GTG GCG CAA GCA AAT CCA
glu gly ala ile leu asn leu lys asn gly leu ala met asp val ala gln ala asn pro
1681/543      1711/553
AAG CTC CGC CGA ATA ATC ATC TAT CCT GCC ACA GGA AAA CCA AAT CAA ATG TGG TTT CCC
lys leu arg arg ile ile ile tyr pro ala thr gly lys pro asn gln met trp leu pro
1741/563      1771/573
GTG CCA TGA TTT AGG TTC ATG GCT CGA AGA TTG CTT GCA TGC GAC CAT CCT TTC TAT TTT
val pro STP
1801/      1831/
CTC TTT TCT ACC TTT TGA AAT AAT GTC TGT GAA TAA TGT GGC ACG TTG AGG CCC GCC GAA
1861/      1891/
AGA AGC CTT AGC CAC CTT GTG TTT GAG AAT AAA TGA GTT AAT GCA AGC AAT CAA CTT CTC
1921/
CTT
```

Sekvensen er avledet fra de klonede ML-genfragmenter "h" (nukleotid 1-204), "f" (nukleotid 205-909), "e" (nukleotid 910-957), "g" (nukleotid 958-1746) og "i" (nukleotid 1747-1923)

Fig. 5

11/27

Konstruksjon av MLA-ekspressjonsvektoren pT7-MLA



12/27

Fig. 5 , fortsettelse

Konstruksjon av MLA-ekspresjonsvektor pT7-MLA

Amplifikasjon av
et MLA-fragment

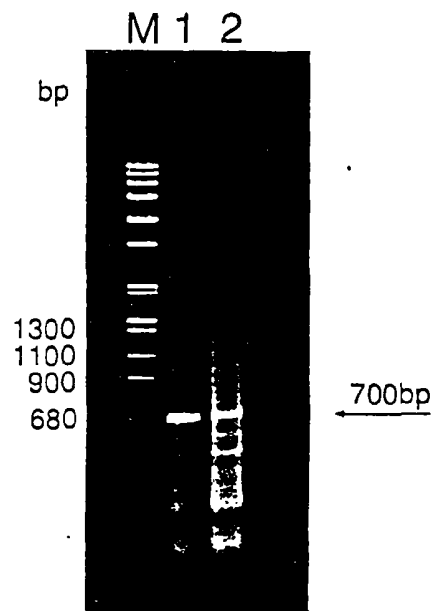


Fig. 6

Konstruksjon av MLB-ekspressjonsvektoren pT7-MLB

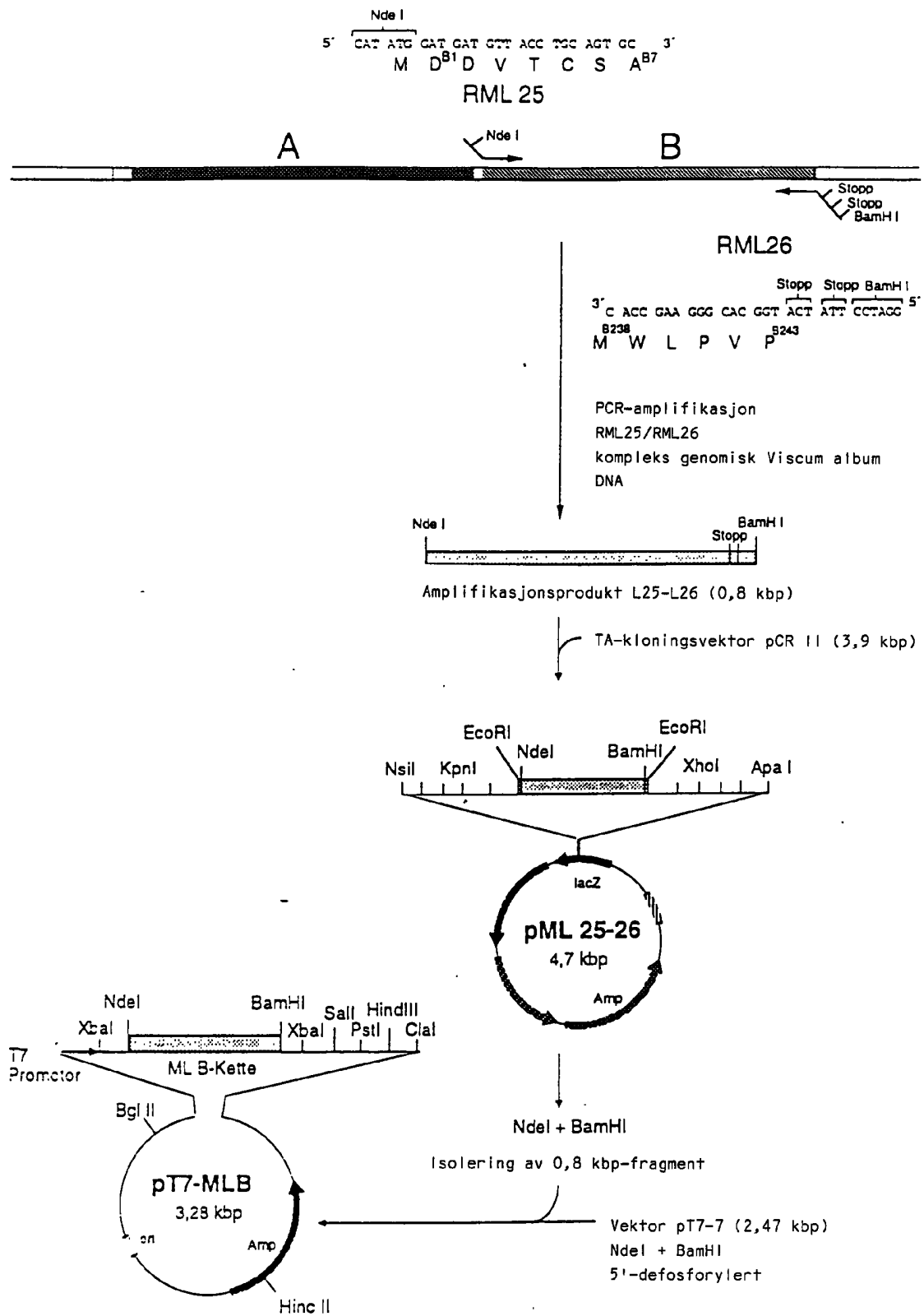


Fig. 6 , fortsettelse

14/27

Konstruksjon av MLB-ekspresjonsvektoren pT7-MLB

Amplifikasjon av
et MLB-fragment

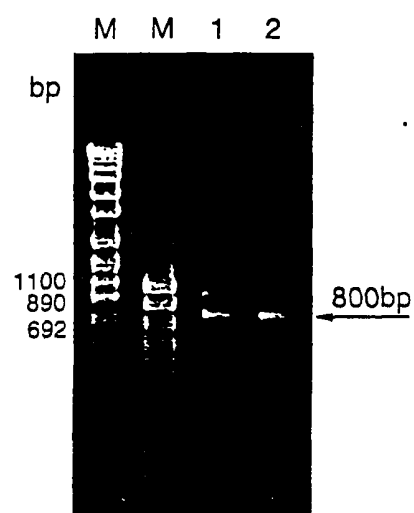
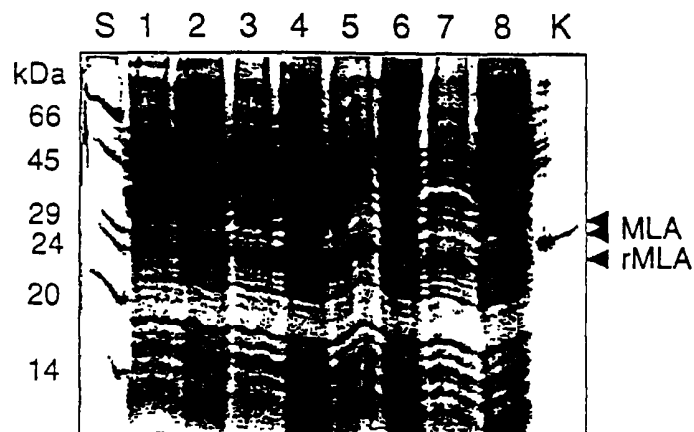
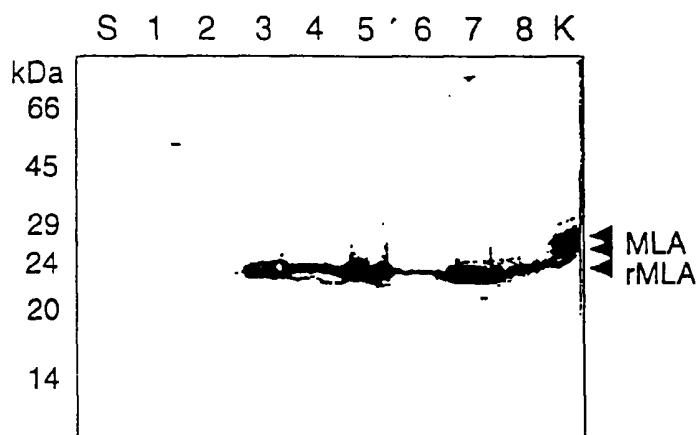


Fig. 7:

Ekspresjon av rMLA og rMLB

a.: Ekspresjon av rMLA-kjeden

SDS-PAGE-undersøkelse av
E. coli BL21/pT7-MLA-lysater

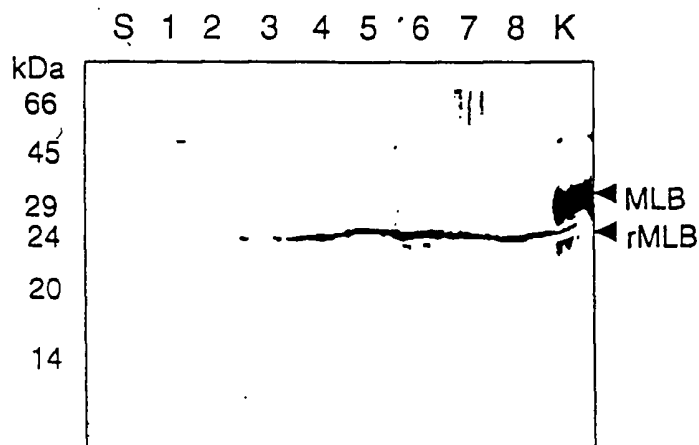
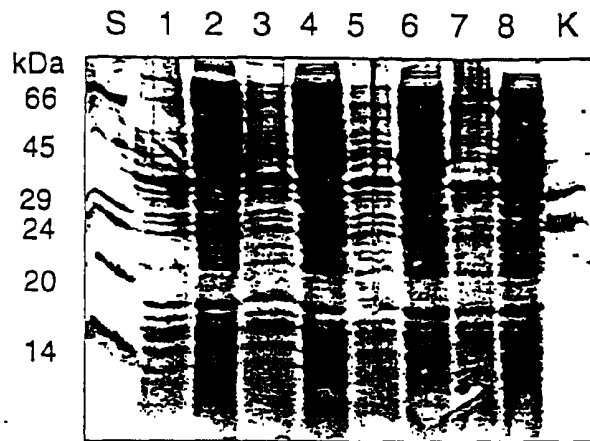


Immunologisk deteksjon
av rMLA (Western-blott)

Fig. 7 , fortsettelse ..

Ekspresjon av rMLA og rMLB

b.: Ekspresjon av rMLB-kjeden



Fia. 8

Isoelektrisk kromatofokusering av rMLA og rMLB mot
MLA, MLB og ML-1-holoprotein

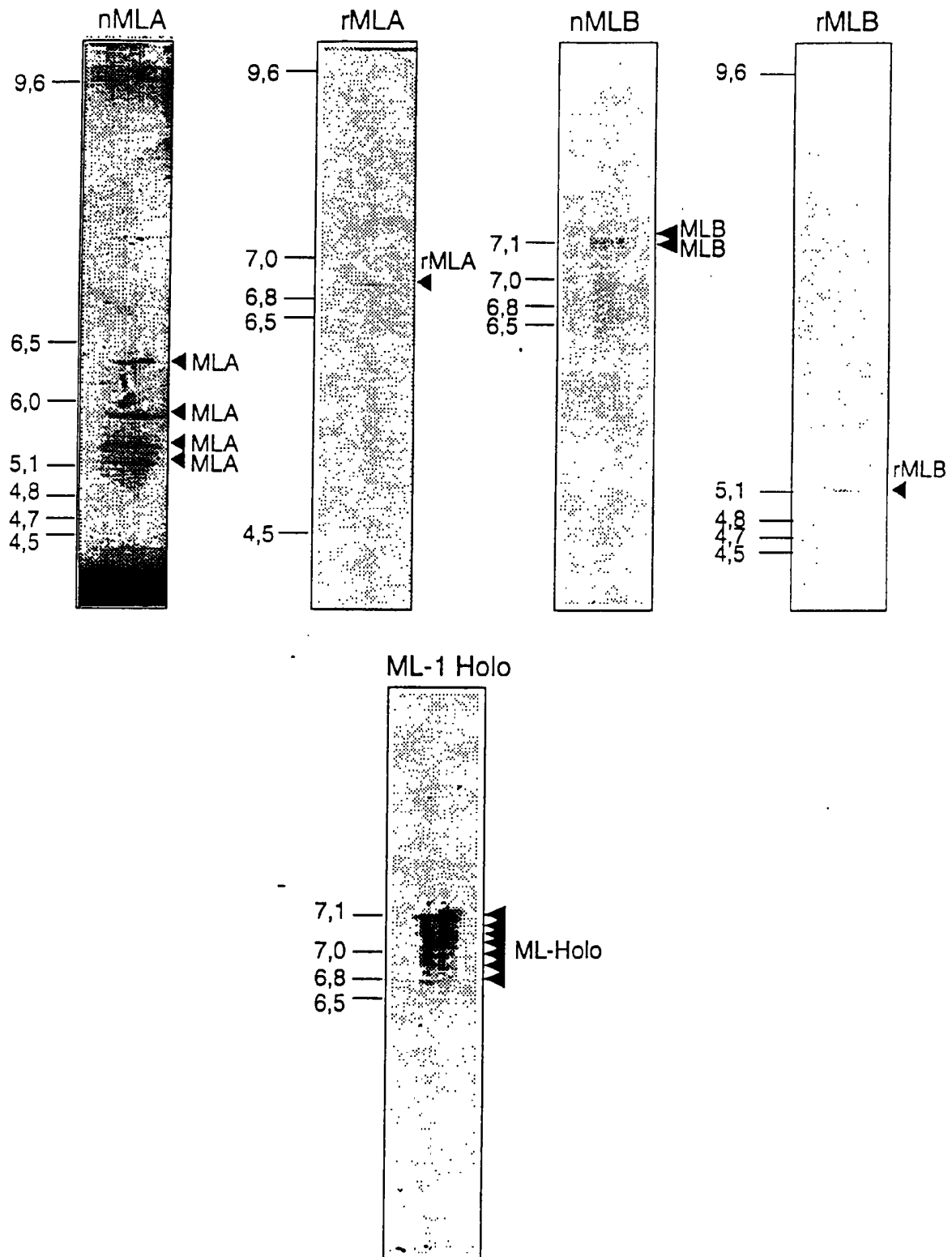


Fig. 9

Enzymatisk aktivitet av rMLA

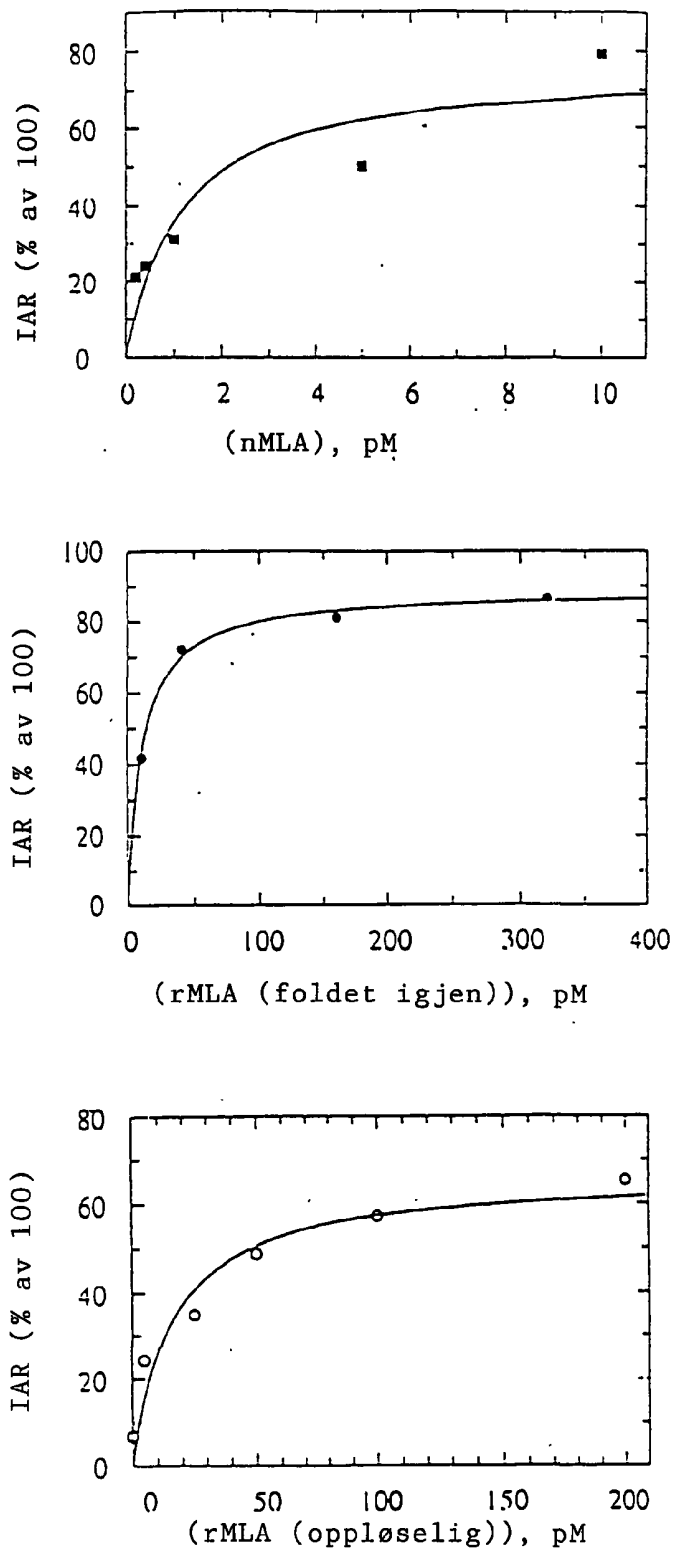


Fig. 10

Karbohydrat-bindekarakteristikk av rMLB

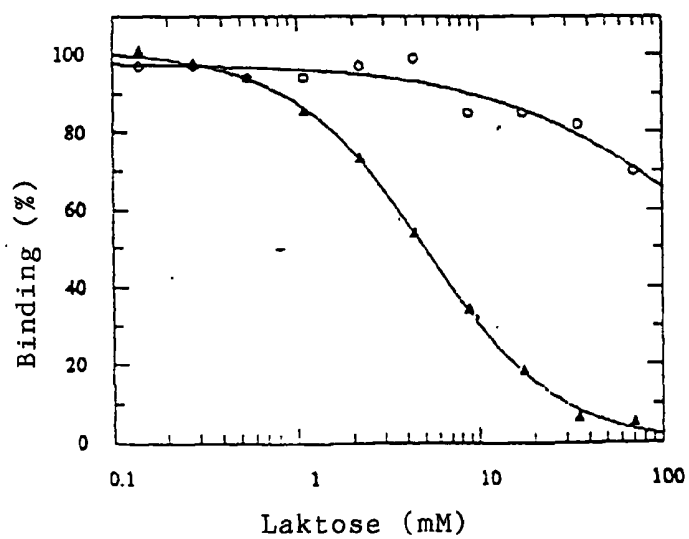
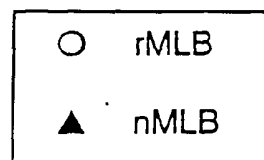
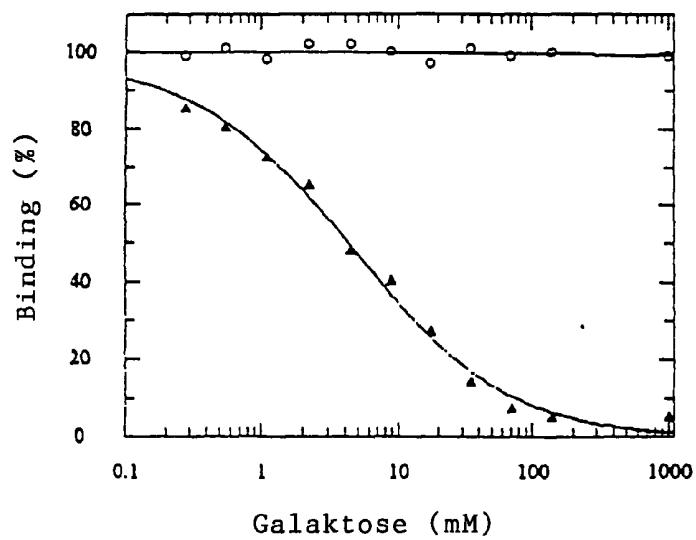


Fig. 10, fortsettelse

Karbohydrat-bindekarakteristikk av rMLB

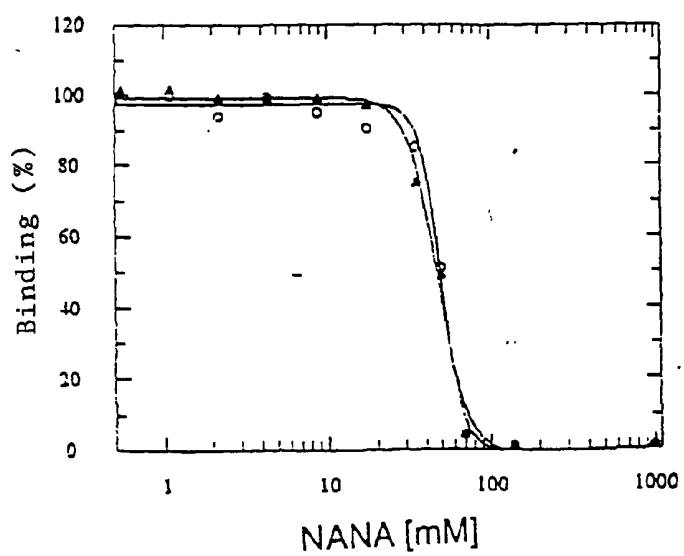
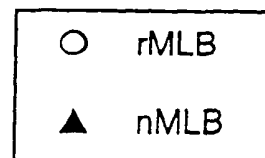
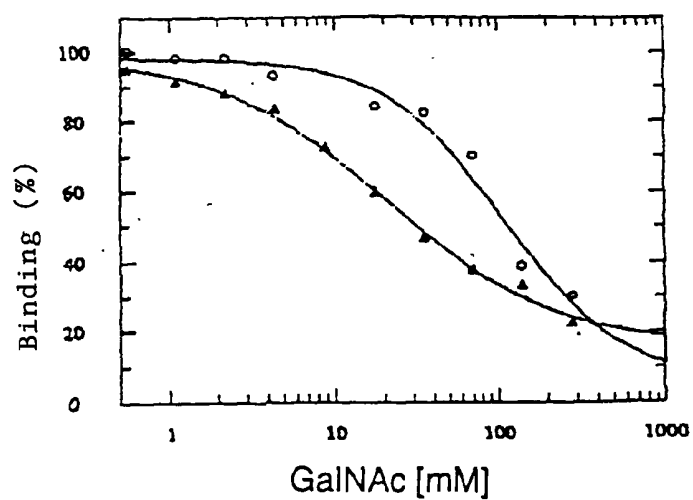


Fig. 11

MOLT4-cytoksisitet av rML

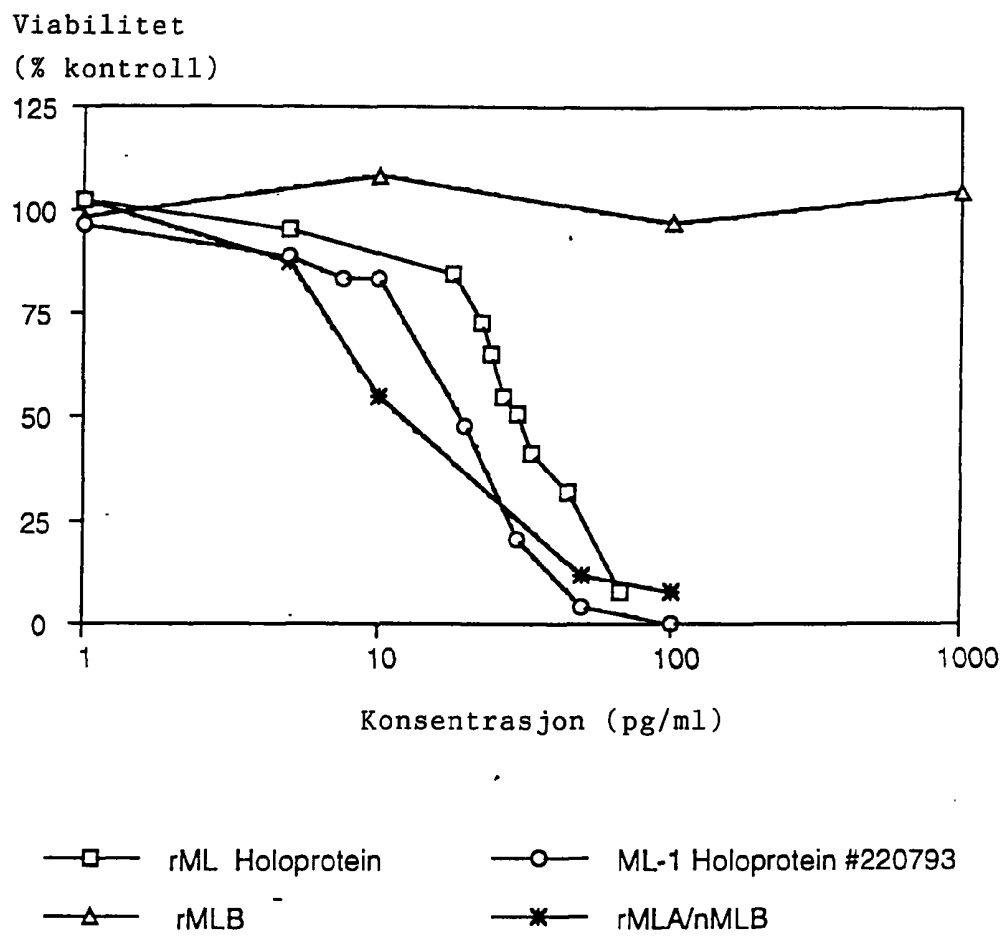


Fig. 12

Apoptose-induksjon ved U937-celler

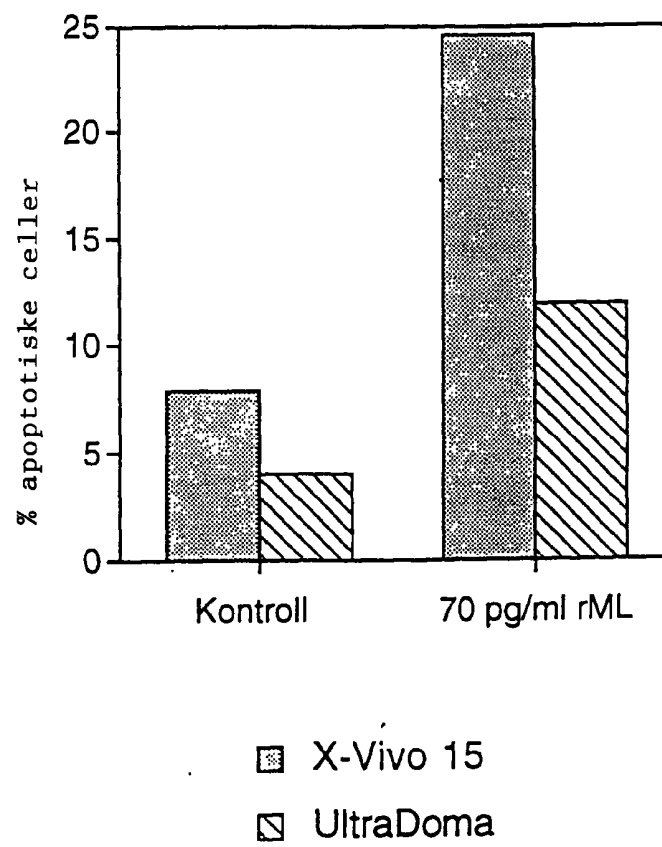


Fig. 13

Immunostimulerende virkning av rekombinant mistellectin
i PBMC-modell

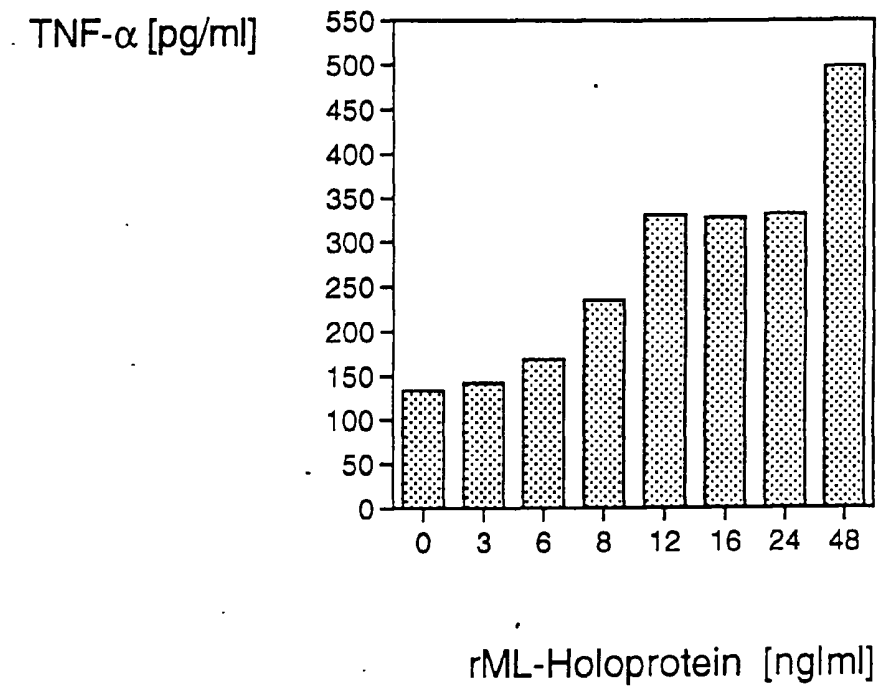
a. Induksjon av frisettingen av $\text{TNF-}\alpha$ 

Fig. 13, fortsettelse

Immunostimulerende virkning av rekombinant mistellectin
i PBMC-modell

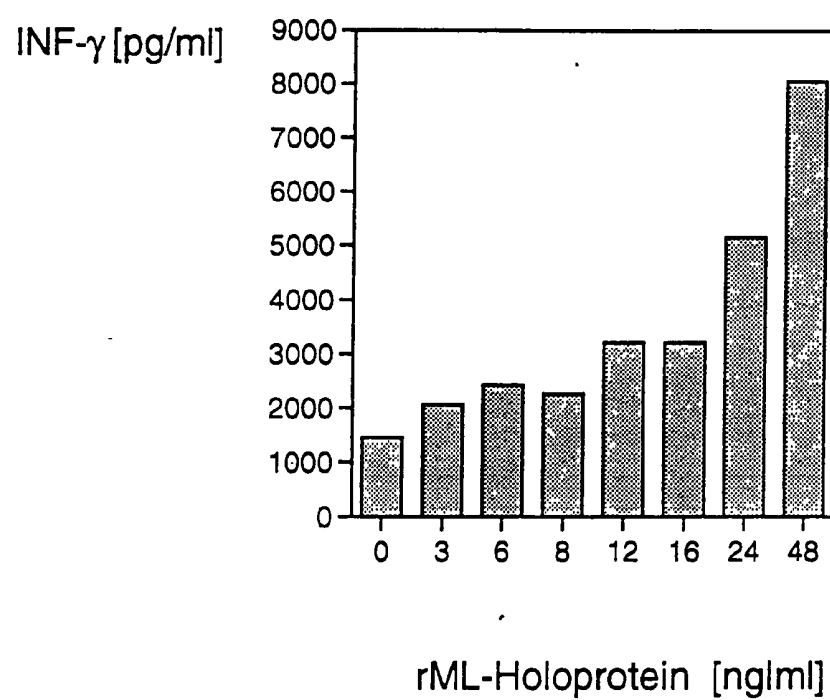
b. Induksjon av frisettingen av IFN- γ 

Fig. 14

Immunostimulerende virkning av rekombinant mistellectin
i skin²-ZK1200-modell

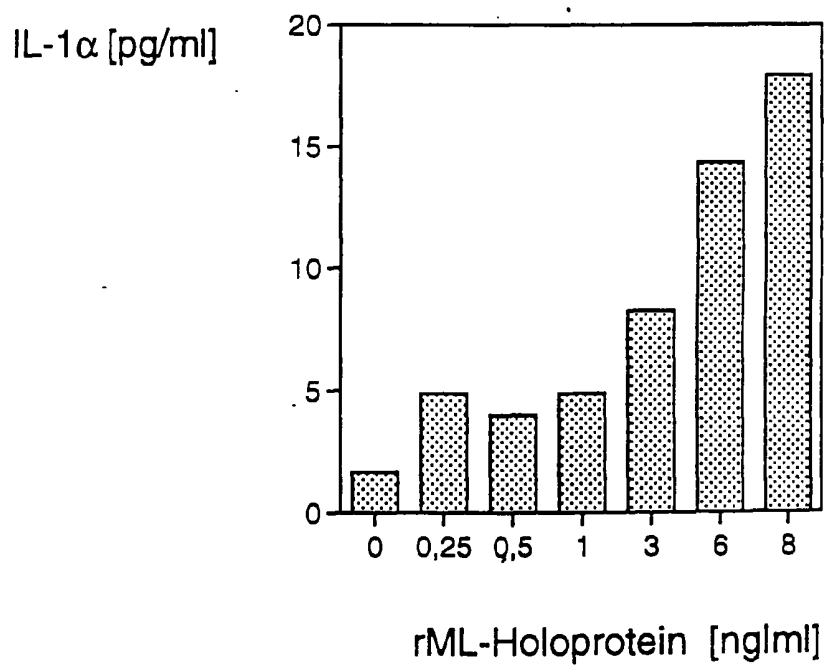
a. Induksjon av frisettingen av IL-1 α 

Fig. 14, fortsettelse

Immunostimulerende virkning av rekombinant mistellectin
i skin²-ZK1200-modell

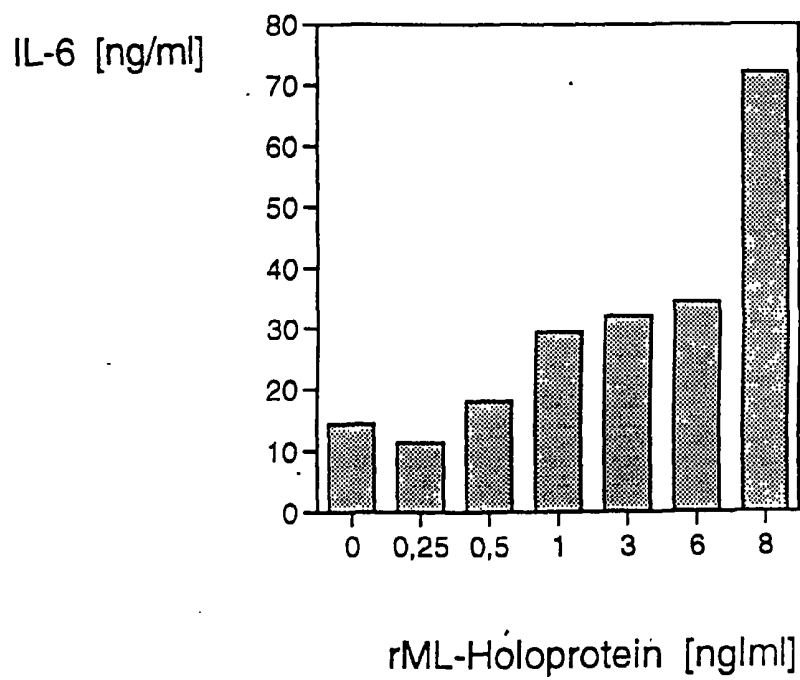
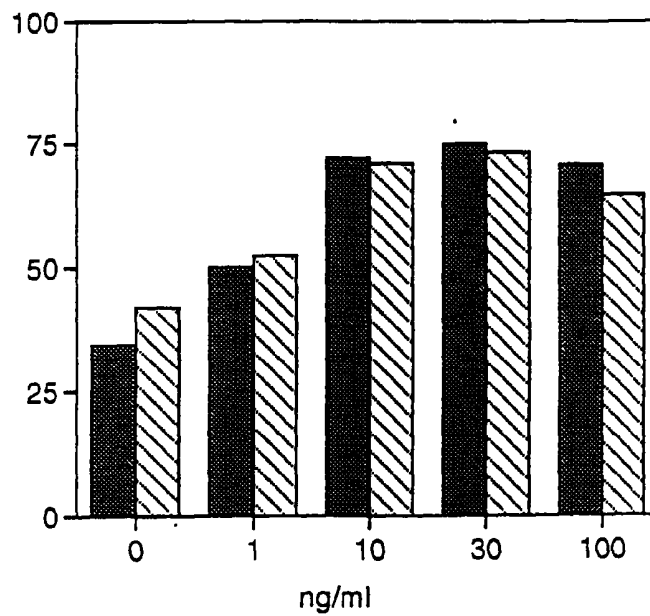
b. Induksjon av frisettingen av IL-6

Fig. 15

CD69-induksjon ved rMLB ved PBMC



■ midlere fluorescens (relative enheter)
▨ positive celler (%)