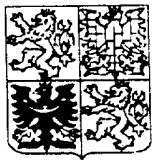
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:
282 523

(19) ČESKÁ REPUBLIKA



ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1412-93**

(22) Přihlášeno: **15. 01. 92**

(30) Právo přednosti:
16. 01. 91 US 91/641347

(40) Zveřejněno: **19. 01. 94**
(Věstník č. 1/94)

(47) Uděleno: **03. 06. 97**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **16. 07. 97**
(Věstník č. 7/97)

(86) PCT číslo: **PCT/US92/00066**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 92/12725**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.[6]:
A 61 K 38/20
// C 12 N 15/24

(73) Majitel patentu:
SCHERING CORPORATION, Kenilworth, NJ, US;

(72) Původce vynálezu:
Vieira Paulo J. M., Mountain View, CA, US;
Moore Kevin W., Palo Alto, CA, US;

(74) Zástupce:
PATENTSERVIS PRAHA, Jívenská 1/1273, Praha 4, 14000;

(54) Název vynálezu:
Použití lidského iterleukinu-10 nebo virového interleukinu-10 pro výrobu léčiva a farmaceutický prostředek pro léčení nádorů interleukin-10 obsahující

(57) Anotace:
Je popsáno použití interleukinu-10 pro výrobu léčiva pro léčení nádorů, a farmaceutický prostředek obsahující interleukin-10.

CZ 282 523 B6

Použití lidského interleukinu–10 nebo virového interleukinu–10 pro výrobu léčiva a farmaceutický prostředek pro léčení nádorů interleukin-10 obsahující

Oblast techniky

Vynález se týká způsobů a prostředků pro léčení neoplasmů nebo rakovin u lidí a zvláště použití prostředků s interleukinem–10 (IL-10) pro léčení rakovin.

Dosavadní stav techniky

Imunologické přístupy k terapii rakovin jsou založeny na představě, že rakovinné buňky se nějakým způsobem vyhýbají obranám těla proti nahodilým nebo cizím buňkám a molekulám a že tyto obrany mohou být terapeuticky stimulovány pro opětovné získání ztracené půdy, např. strany 623 až 648 v Kleinovi "Immunology" (Wiley-Interscience, New York, 1962.). Nedávná pozorování, že některé imunní efektory mohou řídit nebo nepřímo inhibovat růst nádorů, vedla k obnovení zájmu o tento přístup k terapii rakoviny: např. Herberman: Concepts Immunopathol. 1, 96 až 132 (1985) (přirozené killer buňky odolávají růstu nádorových buněk), Rosenberg a spol.: Ann. Rev. Immunol. 4, 681 až 709 (1988) (klinické použití killer buněk (zabiječe) aktivovaných IL-2 pro léčení rakoviny), Ralph a spol.: J. Exp. Med. 167, 712 až 717 (1988) (tumoricidní aktivita makrofágů stimulovaných lymfokiny), Tepper a spol.: Cell 57, 503 až 512 (1989) (IL-4 má protinádorovou aktivitu), M. Cohen "Lymphokines and Tumor Immunity", str. 237 až 253 v S. Cohen (red.) "Lymphokines and the Immune Response" (CRC Press, Boca Raton, 1990.) apod.

Podstata vynálezu

Tento vynález se týká použití interleukinu-10 (IL-10) pro snižování a/nebo zabránění růstu nádorů. Tento vynález zahrnuje také farmaceutické prostředky, které obsahují interleukin-10. Interleukin-10 podle vynálezu se s výhodou vybere ze skupiny, která sestává z maturovaných polypeptidů s otevřenými čtecími oblastmi, které jsou definovány sekvencemi aminokyselin uvedenými v sekvenci identifikační číslo 1 a 2 (všechny sekvence identifikačních čísel jsou uvedeny bezprostředně před body patentových nároků), v nichž jsou k označení L–aminokyselin použity standardní třípísmenové zkratky, při čemž se začíná od N–konce. Na tyto dvě formy IL-10 se někdy odkazuje jako na lidský IL-10 (hIL-10 nebo inhibiční faktor syntézy lidského cytokinu) a na virový IL-10 (vIL-10 nebo BCRF1): např. Moore a spol.: Science 248, 1230 až 1234 (1990), Vieira a spol.: Science 88, 1172 až 1176 (1991), Fiorentino a spol.: J. Exp. Med. 170, 2081 až 2095 (1985), Hsu a spol.: Science 250, 830 až 832 (1990). Výhodněji se maturovaný IL-40 používaný ve způsobu podle tohoto vynálezu vybere ze skupiny sestávající z maturovaných polypeptidů s otevřenými čtecími oblastmi, které jsou definovány aminokyselinovými sekvencemi v sekvencích identifikační číslo 3 a 4 zde uvedených.

V následující části budou stručně popsány připojené výkresy.

Obrázek 1 je diagram znázorňující savčí expresní vektor pcD (SRα).

Obrázek 2 je diagram znázorňující bakteriální expresní vektor TRP–C11.

Obrázek 3 ukazuje plasmid pGSRG, který nese otevřenou čtecí oblast (ORF) myšího IL-10, virového IL-10 nebo lidského IL-10 vloženého do jeho Xho restrikčního místa. Ukazuje také sekvenci RBS–ATG–polylinkerových oblastí konečné konstrukce (nazvané TAC-RBS).

Tento vynález se týká způsobu používání IL-10 pro prevenci a/nebo snižování postupu rakovin. Tento vynález zahrnuje také farmaceutické prostředky obsahující IL-10 pro použití podle tohoto způsobu. IL-10 pro použití podle tohoto vynálezu se vybere ze skupiny maturovaných polypeptidů kódovaných otevřenými čtecími fázemi definovanými cDNA inserty pH5C, pH15C a pBCRF1 (SRα), které jsou uloženy v Americké sbírce typů kultur (American Type Culture Collection; ATCC), Rockville, Maryland, pod čísly 68 191, 68 192 a 68 193.

Pro přípravu polypeptidů podle tohoto vynálezu se používají rozmanité jednobuněčné a vícebuněčné expresní systémy, tj. kombinace hostitel - expresní vektor. Mezi možné typy hostitelských buněk patří, ale nejsou na ně omezeny, bakteriální buňky, kvasinky, hmyzí buňky, savčí buňky apod. Existuje mnoho přehledných souhrnných prací, které jsou dobrými průvodci pro výběry a/nebo modifikace specifických expresních systémů, např. aby byly jmenovány alespoň některé: de Boer a Shepard: "Strategies for Optimizing Gene Expression in Escherichia coli", str. 205 až 247 v Kroon (red.) "Genes: Structure and Expression" (John Wiley and Sons, New York, 1983), přehledný článek několika E. coli expresních systémů; Kucherlapati a spol.: Critical Reviews in Biochemistry 16(4), 349 až 379 (1984) a Banerji a spol.: Genetic Engieering 5, 19 až 31 (1983) podávají přehled způsobů transfekce a transformování savčích buněk; Reznikoff a Goki (red.) "Maximizing Gene Expression" (Butherworths, Boston, 1986) podávají přehled vybraných způsobů exprese genů v E. coli, kvasinkách a v savčích buňkách a Thilly "Mammalian Cell Technology" (Butherworths, Boston, 1986) uvádí přehled savčích expresních systémů. Podobně je dostupno mnoho přehledných souhrnných článků, které popisují techniky a podmínky pro navázání a/nebo manipulaci specifických cDNAs a expresi kontrolních sekvencí při tvorbě a/nebo modifikování expresních vektorů vhodných pro použití podle tohoto vynálezu, např. Sambrook a spol. (viz shora).

E. coli expresní systém je popsán Riggsem v USA patentu č. 4 431 739, který je zde zahrnut jako odkaz. Zvláště užitečným prokarytickým promotorem pro vysokou expresi v E. coli je tac promotor, popsaný de Boerem v USA patentu č. 4 551 433, který je zde zahrnut jako odkaz. Jsou dostupné také sekreční expresní vektory pro E. coli hostitele. Zvláště užitečné jsou pIN–III–ompA vektory popsané Ghrayebem a spol.: EMBO J. 3, 2437 až 2442 (1984), v nichž cDNA, která má být transkribována, je napojena na část E. coli OmpA genu kódujícího signální peptid ompA proteinu, který dále způsobuje, že maturovaný protein je sekretován do periplasmového prostoru bakterie. USA patenty č. 4 336 336 a 4 338 397 popisují také sekreci expresních vektorů pro prokaryoty. Také tyto citace jsou zde zahrnuty jako odkazy.

Vhodnými hostiteli pro prokaryotické expresní vektory jsou četné kmeny bakterií včetně kmenů E. coli, jako je například W3110 (ATCC č. 27 325), JA221, C600, ED767, DH1, LE392, HB101, X1776 (ATCC č. 31 244), X2282, RR1 (ATCC č. 31 343), MRC1, kmeny Bacillus substilis a jiné enterobakterie, jako je například Salmonella typhimurium nebo Serratia marcescens a různé druhy Pseudomonas. Obecné způsoby pro odvození bakteriálních kmenů, jako je E. coli K12 X1776, použitelných pro expresi eukaryotických proteinů, jsou popsány Curtisem III v USA patentu č. 4 190 495. Tento patent je zde také zahrnut jako odkaz.

U prokaryotických a eukaroytických mikrogranismů se pro přípravu proteinů podle tohoto vynálezu používají také expresní systémy obsahující buňky odvozené od vícebuněčných organismů. Zvláště zajímavé jsou savčí expresní systémy, protože jejich posttranslační opracování pravděpodobněji produkuje biologicky aktivní savčí proteiny. Jako vektory pro savčí hostitele bylo použito několik DNA nádorových virů. Zvláště důležité jsou četné vektory, které obsahují SV40 replikační, transkripční a/nebo translační kontrolní sekvence kondenzované

s bakteriálními replikačními kontrolními sekvencemi, např. pcd vektory vyvinuté Okayamou a Bergen, které jsou popsány v Mol. Cell. Bilo. 2, 161 až 170 (1982) a Mol. Cell. Biol. 3, 280 až 289 (1983) a zlepšené Takefou a spol.: Mol. Cell. Biol. 8, 466 až 472 (1988). Také tyto citace jsou zde zahrnuty jako odkaz. Mezi další na SV40 založené savčí expresní vektory patří ty, které byly popsány Kaufmanem a Sharpem v Mol. Cell. Biol. 2, 1304 až 1319 (1982) a Clarkem a spol. v USA patentu č. 4 675 285, obě tyto citace jsou zde zahrnuty jako odkazy. Výhodnými hostiteli shora uvedených vektorů jsou opičí buňky. Tyto vektory obsahující sekvence SV40 počátku replikace a neporušený A gen se mohou replikovat autonomně v opičích buňkách (aby se získaly vysoké počty kopií a/nebo stabilnější počet kopií než u neautonomně replikujících plasmidů). Navíc vektory obsahující sekvence SV40 počátku replikace bez neporušeného A genu se mohou replikovat autonomně v opičích buňkách COS7 ve vysokém počtu kopií (ale nestabilně), jak je to popsáno Gluzmanem: Cell. 23, 175 až 182 (1981). Tyto buňky jsou dostupné od ATCC (pod číslem CRL 1651). Shora uvedené vektory založené na SV40 jsou schopny transformovat také jiné savčí buňky, jako jsou například myší L buňky, integrací do DNA hostitelské buňky.

Pro přípravu polypetidů podle vynálezu se mohou používat také vícebuněčné organismy, například hmyzích larev, Maeda a spol.: Nature 315, 592 až 594 (1985) a Ann. Rev. Entomol. 351 až 372 (1989), a transgenních živočichů, Jaenisch: Science 240, 1468 až 1474 (1988).

I. Testování interleukinu-10: IL-10 vykazují některé biologické účinky, které by mohly být základem pro testy a jednotky. IL-10 mají vlastnost inhibovat syntézu alespoň jednoho cytokinu ve skupině sestávající z IFN-τ, lymfotoxinu, IL-2, IL-3 a GM-CSF v populaci T pomocných buněk indukovaných tak, aby syntetizoval jeden nebo více těchto cytokinů vystavením působení buněk se syngenním antigenem (APCs) a antigenu. U této aktivity se APCs nechají zpracovat tak, že nejsou schopny replikovat, ale jejich antigen-opracovávající systém zůstává funkční. Toho se vhodně dosáhne ozářením APCs, např. asi 1500 až 3000 R (záření τ nebo X) před tím, než se smíchají s T buňkami.

Inhibice cytokinu se může testovat také primární nebo výhodněji sekundární MLR (mixed-lymphocyte reaction; reakce smíchaných lymfocytů)). V tomto případě není potřeba používat syngenních APCs. MLR jsou dobře známy odborníkům, např. Bradley, str. 162 až 166 v Mishell a spol. (red.): "Selected Methods in Celluar Immunology" (Freeman, San Francisco, 1980) a Battisto a spol.: Meth. In Enzymol. 150, 83 až 91 (1987). Ve stručnosti - smíchají se dvě populace allogenních lymfoidních buněk, jedna populace se před smícháním zpracuje tak, aby se zabránilo proliferaci, např. ozářením. Populace buněk se s výhodou připraví v koncentraci asi 2.10^6 buněk na ml v doplněném médiu, např. RPMI 1640 s 10 % plodového telecího séra. Pro test jak kontrol, tak testovaných kultur se smíchá 0,5 ml každé populace. U sekundární MLR se buňky, které zbývají po sedmi dnech v primární MLR, restimulují čerstvě připravenými ozářenými stimulátorovými buňkami. Vzorek, o kterém se předpokládá, že obsahuje IL-10, se může přidat k testovaným kulturám v době smíchání a jak kontroly tak testované kultury se testují na produkci cytokinu v době 1 až 3 dny po smíchání.

Testy na IL-10 se získanými populacemi T buněk a/nebo APC populacemi používají způsoby, které jsou dobře známy odborníkům a které jsou plně popsány DiSabatem a spol. (red.).: Meth. In Enzymol. 108 (1984). APCs pro výhodný IL-10 jsou periferní krevní monocyty. Tyto monocyty se získávají standardními způsoby, např. způsobem popsaným Boyumem: Meth. In Enzymol. 108, 88 až 102 (1984), Mage: Meth. In Enzymol. 108, 118 až 132 (1984), Litvin a spol.: Meth. In Enzymol. 108, 298 až 302 (1984), Stevenson: Meth. In Enzymol. 108, 242 až 249 (1989) a Romain a spol.: Meth. in Enzymol. 108, 148 až 153 (1984), které jsou zde zahrnuty jako odkazy. V IL-10 testech se s výhodou používají pomocné T buňky, které se získávají nejdříve oddělením lymfocytů z periferní krve a potom vybráním, např. "panning" nebo průtokovou cytometrií, pomocných buněk pomocí komerčně dostupných anti-CD4 protilátek, např. OKT4

popsaných v USA patentu č. 4 381 295 a dostupných od Ortho Pharmaceutical Corp. Potřebné způsoby jsou plně popsány Boymem ve Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21, (Suppl. 97), 77 (1968), v Meth. In Enzymol. 108 (shora uvedená citace) a Bramem a spol.: Meth. In Enzymol. 121, 737 až 747 (1986). Obvykle se PBLs získávají z čerstvé krve odstřeďováním Ficoll–Hypaque hustotním gradientem.

V testu se mohou používat rozmanité antigeny, např. KLH (Keyhole limpet hemocyanin), drůbeží τ–globulin nebo podobné. Výhodněji, místo antigenu, jsou pomocné T buňky v testu stimulovány anti–CD3 monoklonální protilátkou, např. OKT3 popsanou v USA patentu č. 4 361 549.

Koncentrace cytokinu v kontrolních a testovaných vzorcích se měří standardními biologickými a/nebo imunochemickými testy. Konstrukce imunochemických testů pro specifické cytokiny jsou dobře známy odborníkům, jestliže je dostupný vyčištěný cytokin, např. Campbell "Monoclonal Antibody Technology" (Elsevier, Amsterodam, 1984), Tijssen: "Practise and Theory of Enzyme Immunoassays" (Elsevier, Amsterodam, 1985) a USA patent číslo 4 486 530 jsou příklady rozsáhlé literatury o tomto předmětu. Komerčně dostupné od Goenzyme Corp. (Boston, Ma.) jsou ELISA sestavy pro lidský IL-2, lidský IL-3 a lidský GM-CSF a ELISA sestava pro lidský IFN-τ komerčně dostupný od Endogen, Inc. (Boston, Ma.). Polyklonální protilátky specifické pro lidský lymfotoxin, které jsou dostupné od Goenzyme Corp., se mohou používat v radioimunoanalýze lidského lymfotoxinu, např. Chard: "An Introduction to Radioimmunoassay and related Techniques" (Elsevier, Amsterodam, 1982).

Pro stanovení IL-10 aktivity se mohou použít také shora uvedené biologické analýzy cytokinů. Biologická analýza lidského lymfotoxinu je popsána Aggarwalem: Meth. In Enzymol. 116, 441 až 447 (1985) a Matthewesem a spol.: str. 221 až 225 Clemensem a spol. (red.) "Lymphokines and Interferons: A Practical Approach" (IRL Press, Washington, D.C., 1987). Lidský IL-2 a GM-CSF se mohou analyzovat na faktoru závislými buněčnými liniemi CTLL-2 a KG-1, které jsou dostupné od ATCC pod čísly TIB 214 a CCL 246. Lidský IL-3 se může analyzovat svojí schopností stimulovat tvorbu rozmanitých hematopoietických kolonií v kulturách měkkého agaru, např. jak popsal Metcalf: "The Hemopoietic Colony Stimulating Factors" (Elsevier, Amsterodam, 1984). INF-τ lze kvantifikovat antivirovými analýzami, např. Maeger, str. 129 až 147 v Clemensen a spol. (red.) (shora uvedená citace).

Produkce cytokinu se může zjišťovat mRNA analýzou. Cytokinové mRNA se mohou měřit cytoplasmovou tečkovací hybridizací jak popsali White a spol.: J. Biol. Chem. 257, 8569 až 8572 (1982) a Gillespie a spol.: USA patent č. 4 483 920. Také tyto citace jsou zde zahrnuty jako odkazy. Mezi další možné přístupy patří blotování tečkováním s využitím vyčištěné RNA, např. kapitola 6 v Hames a spol. (red.): "Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach" (IRL Press, Whashington, D.C., 1985).

V některých případech se vzorky, které se mají testovat na IL-10 aktivitu, musí předem zpracovat tak, aby se odstranily cytokiny, které mohou interferovat s testem. Například IL-2 zvyšuje produkci IFN-τ v některých buňkách. Podle toho, jaké pomocné T buňky se v testu používají, se IL-2 odstraňuje ze vzorku, který je testován. Takové odstranění se vhodně provádí tak, že se vzorek nechá projít standardní kolonou s anti-cytoklinovou aktivitou.

Z důvodů vhodnosti se jednotky IL-10 aktivity definují v pojmech schopnosti IL-10 zvětšit proliferaci MC/9 buněk indukovanou IL-4, které jsou popsány v USA patentu č. 4 559 310 a které jsou dostupny od ATCC pod číslem CRL 8306. 1 jednotka/ml je definována jako taková koncentrace IL-10, která poskytuje 50 % maxima stimulace MC/9 proliferace nad hladinou IL-4 v následujícím testu: Připraví se dvojí nebo trojí zředění IL-4 a IL-10 v 50 μl média na jamku na standardní mikrotitrovací desce; médium obsahuje RPMI 1640, 10 % plodového telecího séra,

50 μM 2–merkaptoethanol, 2mM glutamin, penicilin (100 jednotek na litr) a streptomycin (100 μg/l). Přidá se IL-4, 25 μl/jamku 1600 jednotek/ml (konečných 400 jednotek/ml) zředěných médiem a inkubuje se přes noc, např. 20 až 24 hodin. Přidá se ^{3}H–thymidin (např. 50 mikroCi/ml v médiu) při hodnotě 0,5 až 1,0 μCi/jamku a opět se buňky inkubují přes noc, potom se buňky isolují a změří se obsažená radioaktivita.

II. Čištění a farmaceutické prostředky: Jestliže k expresi polypeptidů podle tohoto vynálezu dochází v rozpustné formě, například jako sekretovaný produkt transformovaných kvasinek nebo savčích buněk, mohou se tyto polypeptidy vyčistit standardními způsoby známými odborníkům, včetně stupňů srážení síranem amonným, chromatografie na ionexu, gelové filtrace, elektroforesy, afinitní chromatografie a/nebo podobných, např. "Enzyme Purification and Related Techniques", Methods in Enzymology 22, 233 až 577 (1977) a Scopes R.: "Protein Purification: Principles and Practice" (Springer - Verlag, New York, 1982) poskytují návody pro tato čištění. Podobně jestliže se polypeptidy podle tohoto vynálezu získávají expresí v nerozpustné formě, například jako agregáty, inkluzní tělesa nebo podobně, mohou se vyčistit standardními postupy známými odborníkům, mezi něž patří oddělení inkluzních tělísek z rozbitých buněk odstřeďováním, solubilizací inkluzních těles chaotropními činidly a redukujícími činidly, zředěním solubilizované směsi a snížením koncentrace chaotropního činidla a redukujícího činidla tak, že polypeptid zaujme biologicky aktivní konformaci. Poslední postupy jsou uvedeny v následujících citacích, které jsou zde zahrnuty jako odkazy: Winkler a spol.: Biochemistry 25m 4041 až 4045 (1986), Winkler a spol.: Biotechnology 3, 992 až 998 (1985), Koths a spol.: USA patent č. 4 569 790 a Evropské patentové přihlášky číslo 86306917.5 a 86306353.3.

Pojem "efektivní množství" tak, jak je zde používán, znamená množství postačující pro snížení nebo zabránění růstu nádoru. Efektivní množství pro příslušného pacienta se může měnit podle závislosti na takových faktorech, jako je stav a typ nádorového onemocnění, které se má léčit, celkový zdravotní stav pacienta způsob podávání, prudkost vedlejších účinků apod. Obvykle se IL-10 podává jako farmaceutický prostředek obsahující efektivní množství IL-10 a farmaceutický nosič. Farmaceutický nosič může znamenat jakoukoliv slučitelnou, netoxickou látku, která je vhodná pro dodávání prostředků podle tohoto vynálezu pacientovi. Obecně jsou prostředky užitečné pro parenterální podávání takových léčiv dobře známy, např. "Remington's Pharmaceutical Science", 15. Vydání (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). Prostředky podle tohoto vynálezu se mohou do těla pacienta zavádět také implantovatelným nebo injektovatelným systémem pro dodávání léčiva: např. Urquhart a spol.: Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24, 199 až 236 (1984), Lewis a sol.: "Controlled Release of Pesticides and Pharmaceuticals" (Plenum Press, New York, 1981), USA patent č. 3 773 919, USA patent č. 3 270 960 a podobné.

Jestliže se podává parenterálně, pak se IL-10 připraví (formuluje) jako jednotková dávková injektovatelná forma (roztok, suspense, emulze) společně s farmaceutickým nosičem. Mezi příklady takových nosičů patří normální solný roztok, Ringerův roztok, roztok dextrosy a Hankův roztok. Mohou se používat také nevhodné nosiče, jako jsou například netuhnoucí oleje a ethyl–oleát. Vhodným nosičem je 5% roztok dextrosy v solném roztoku (roztoku chloridu sodného ve vodě). Nosič může obsahovat menší množství přísad, jako jsou například látky, které zvyšují isotoničnost roztoku a chemickou stabilitu, například pufry a ochranná činidla. IL-10 se s výhodou připravuje ve formě prostředku ve vyčištěné formě, která v podstatě neobsahuje agregáty a další proteiny v koncentraci od asi 5 do asi 20 μg/ml. IL-10 se s výhodou podává kontinuální infusí tak, že jeho množství se pohybuje v rozmezí asi 50 až 800 μg podávaných denně (tj. asi 1 až 16 μg/kg/den). Denní infuzní rychlost se může měnit podle sledování vedlejších účinků a podle počtu červených krvinek.

Příklady provedení vynálezu

Následující příklady slouží pro ilustraci tohoto vynálezu. Zvolené vektory a zvolení hostitelé, koncentrace reakčních činidel, teploty a hodnoty dalších proměnných jsou pouze příklady aplikací podle tohoto vynálezu a nejsou považovány jako omezení tohoto vynálezu.

Příklad 1

Exprese lidského CSIF v bakteriálním hostiteli

Z řady chemicky syntetizovaných fragmentů dvouvláknové DNA se sestaví syntetický lidský CSIF gen. Vytvoří se tak expresní vektor označený TAC-RBS–hCSIF. Klonování a exprese se provádí ve standardním bakteriálním systému, například E. coli K-12 kmenu JM101, JM103 nebo podobných, popsaných Vierou a Messingem: Gene 19, 259 až 268 (1982). Štěpení restrikčními endonukleasami a reakce s ligami se provádí podle standardních postupů, například Maniatis a spol.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982).

Alkalický způsob (Maniatis a spol., shora uvedená citace) se používá pro přípravu plasmidu v malém měřítku. Pro přípravy ve velkém měřítku se používá modifikace alkalického způsobu, podle něhož se pro vysrážení nukleových kyselin z vyčeřeného lyzátu použije stejný objem isopropanolu. Vysrážení studeným 2,5M octanem amonným se používá pro odstranění RNA před odstřeďováním rovnovážnou hustotou chloridu cesného a detekcí ethidiumbromidem.

Při hybridizaci na filtru se pro přenesení kolonií, které se pak lysují a fixují reakcí (vždy po dobu dvou minut) s 0,5M NaOH, 1,5M NaCl a potom s 1M Tris.HCl, pH 8,0, 1,5M NaCl a následujícím zahřátím na 80 °C (30 minut), se používají kolečka filtru Whatman 540. Hybridizace se provádí v 6 x SSPE, 20% formamidu, 0,1% dodecylsulfátu sodném (SDS), 100 mg/ml E. coli tRNA, 100 mg/ml barviva Coomassie Brilliant Blue G-250 Bio-Rad) při 42 °C po dobu 6 hodin s použitím ^{32}P-značených (kinasovaných) syntetických DNAs (20 x SSPE se připraví rozpuštěním 174 g NaCl, 27,6 g $NaH_2PO_4.9H_2O$ a 7,4 g ethylendiaminotetraoctové kyseliny v 800 ml vody. pH se upraví hydroxidem sodným na 7,4, objem se upraví na 1 litr a vzorek se steriluje v autoklávu). Filtry se promyjí dvakrát (15 minut, teplota místnosti) 1 x SSPE, 0,1% SDS. Po autoradiografii (Fuji RX film) se positivní kolonie umístí na filtry seřazením vyrostlých kolonií modře vybarvených. DNA se sekvenuje dideoxymetodou, Sanger a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463 (1977). Templáty pro dideoxy-reakce jsou buď jednovláknové DNA příslušných oblastí reklonované do vektorů M13mp (např. Messing a spol.: Nucleic Acids Res. 9, 309 (1981), nebo dvouvláknová DNA připravená minialkalickým způsobem a denaturovaná 0,2M hydroxidem sodným (5 minut, teplota místnosti) a vysrážená z 0,2M hydroxidu sodného a 1,43M octanu amonného přidáním dvou objemů ethanolu. DNA se může syntetizovat fosforamiditovou chemií syntetizátorem Applied Biosystems 380A Synthesizer; syntéza, odstranění chránicích skupin, štěpení a vyčištění (7M močovinová PAGE, eluce, chromatografie na DEAE–celulose) se provádí tak, jak je to popsáno v příručce pro syntetizátor 380A.

Doplňková vlákna syntetických DNA, které se mají klonovat (každé 400 ng), se smíchají a fosforylují polynukleotidkinasou v reakci o objemu 50 ml. Tato DNA se liguje v objemu 50 ml za teploty místnosti 4 až 12 hodin s 1 mg vektorové DNA rozštěpené příslušným restrikčním enzymem. Podmínky pro fosforylaci, štěpení restrikčními enzymy, polymerasové reakce a ligaci, jsou popsány v literatuře (Maniatis a spol.: shora uvedená citace). Spočtou se kolonie na lacZ+ (jestliže je to žádáno) vysetím na L agar doplněný o ampicilin, isopropyl–1–thiobeta–D–galaktosid (IPTG) (0,4mM) a 5–brom–4–chlor–3–indolyl–beta–D–galaktopyranosid (x-gal) (40 mg/ml).

Vektor TAC-RBS se zkonstruuje doplněním DNA polymerasou jediného Bam HI místa tacP-nesoucího plasmidu pDR540 (Pharmacia). Ten se potom liguje s nefosforylovanými oligonukleotidy (Pharmacia), které tvoří dvojvláknový fragment kodující souhlasné ribosomové vazebné místo, jak je to uvedeno v sekvenci identifikační číslo 5, a označí se RBS. Po ligaci se směs fosforyluje a religuje s SstI linkerem ATGAGCTCAT. Tento komplex se pak rozštěpí působením SstI a EcoRI. Elektroforesou na polyakrylamidovém gelu (PAGE) se isoluje fragment o 173 párech nukleotidů (pn). Tento fragment se klonuje do pUC19 (Pharmacia) rozštěpeného působením EcoRI a SstI (jak shora popsáno). Sekvence RBS-ATG-polylinkerových oblastí konečné konstrukce (nazvaná TAC-RBS) je uvedena na obrázku 3.

Tento syntetický IL-10 gen se vestaví do plasmidu pUC19 v osmi stupních. V každém stupni inserty bez delecí a/nebo insercí se mohou detegovat po klonování zachováním lacZ(α) genu pUC19 v oblasti s ATG start kodonem vloženým ve stupni 1. Klony, které obsahují deleční a/nebo inserční změny, se mohou odfiltrovat vyhodnocením modrých kolonií na L-ampicilinových deskách obsahujících x-gal a IPTG. V každém stupni se sekvence insertů mohou snadno potvrdit použitím universálního sekvenačního primeru při přípravách plasmidové DNA v malém měřítku, např. dostupných od Boehringer Mannheim.

Ve stupni 1 se vektor TAC-RBS rozštěpí působením SstI, nechá se zreagovat ss T4 DNA polymerasou (jejíž 3´–exonukleasová aktivita štěpí 3´-přečnívající vlákna SstI štěpů za vzniku fragmentů se zarovnanými konci) a po deaktivaci T4 DNA polymerasy, se nechá zreagovat s EcoRI. Vznikne tak fragment o 173 párech nukleotidů obsahující TAC-RBS oblast, který má zarovnaný konec na ATG start kodonu a EcoRI rozštěpení na opačném konci. Nakonec se isoluje fragment TAC-RBS o173 párech nukleotidů.

Ve stupni 2 se isolovaný TAC-RBS fragment ze stupně 1 smíchá s plasmidem pUC19 rozštěpeným působením EcoRI a KpnI a syntetický fragment 1A/B uvedený v níže uvedené sekvenci identifikační číslo 6 má zarovnané konce na konci proti směru vlákna a posunuté konce odpovídající štěpu KpnI na svém konci po směru vlákna. Tento KpnI konec je přilehlý k místu BstEII o po směru vlákna místa BstEII. Tyto fragmenty se ligují. Vytvoří se pUC19 stupně 2.

Ve stupni 3 se syntetický fragment 2A/B uvedený v sekvenci identifikační číslo 7 a 3A/B uvedený v sekvenci identifikační číslo 8 smíchá s plasmidem pUC19 ze stupně 2 rozštěpeným působením BstEII a SmaI (po amplifikaci a vyčištění) a liguje se za vzniku plasmidu pUC19 stupně 3. Povšimněte si, že konec po směru vlákna fragmentu 3A/B obsahuje další nukleotidy, které tvoří SmaI zarovnaný konec. Tyto další nukleotidy jsou štěpeny ve stupni 4. Také fragmenty 2A/B a 3A/B mají doplňkové jednovláknové konce o 9 zbytcích, které se anelují po smíchání a zanechávají tak BstEII štěp 2A/B proti směru vlákna a zarovnaný konec 3A/B po směru vlákna pro ligování na pUC19.

Ve stupni 4 se pUC19 ze stupně 3 rozštěpí působením AflII a XbaI, amplifikuje, vyčistí, znovu vyčistí, smíchá se syntetickým fragmentem 4A/B uvedeným v sekvenci identifikační číslo 9 a liguje za vzniku pUC19 za stupně 4.

Ve stupni 5 se pUC19 ze stupně 4 rozštěpí působením XbaI a SalI, amplifikuje a vyčistí, smíchá se syntetickým fragmentem 5A/B uvedeným v sekvenci identifikační číslo 10 a liguje se za vzniku pUC190 ze stupně 5. Povšimněte si, že SalI posunutý konec fragmentu 5A/B se odstraní štěpením působením HpaI ve stupni 6.

Ve stupni 6 se pUC19 ze stupně 5 rozštěpí působením HpaI a PstI, amplifikuje, vyčistí, smíchá se syntetickým fragmentem 6A/B uvedeným v sekvenci identifikační číslo 11 a liguje za vzniku pUC19 ze stupně 6.

Ve stupni 7 se pUC19 ze stupně 6 rozštěpí působením ClaI a SphI, amplifikuje, vyčistí, smíchá se syntetickým fragmentem 7A/B uvedeným v sekvenci identifikační číslo 12 a liguje za vzniku pUC19 ze stupně 7.

Ve stupni 8 se pUC ze stupně 7 rozštěpí působením MluI a HindIII, amplifikuje, vyčistí, smíchá se syntetickými fragmenty 8A/B uvedený v sekvenci identifikační číslo 13 a 9A/B uvedeným v sekvenci identifikační číslo 14 a liguje za vzniku konečné konstrukce, která se pak vloží do E. coli K–12 kmen JM101, např. dostupný od ATCC pod číslem 33 876, standardními způsoby. Po kultivaci se protein extrahuje z buněk JM101. Zředění extraktů se testují na biologickou aktivitu.

Příklad 2

Exprese vIL-10 v opičích buňkách COS 7

Gen, který koduje otevřenou čtecí oblast pro vIL-10, se amplifikuje polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) s použitím primerů, které umožňují pozdější vložení amplifikovaného fragmentu do vektoru pcD(SRα) rozštěpeného působením EcoRI (obrázek 1). Kodující vlákno vloženého fragmentu je uvedeno v sekvenci identifikační číslo 15.

Klony, které nesou insert v příslušné orientaci, se identifikují expresí vIL-10 a/nebo elektroforetickou sestavou restrikčních štěpů. Jeden takový vektor, nesoucí gen vIL-10, se označí pBCRF1(SRα). Tento vektor byl uložen v ATCC pod číslem 68 193. PBCRF1(SRα) se amplifikuje v E. coli MC1061, isoluje se standardními způsoby a použije se pro transfekci opičích buněk COS 7 následujícím způsobem: Jeden den před transfekcí se přibližně $1{,}5.10^6$ opičích buněk COS 7 vyseje na jednotlivé 100 mm misky v Eaglově médiu modifikovaném podle Dulbecca (DME), které obsahuje 5 % plodového telecího séra (FCS) a 2 mM glutaminu. Pro provedení transfekce se buňky COS 7 odstraní z misek inkubací s trypsinem, promyjí se dvakrát DME bez séra a suspendují se na množství 10^7 buněk/ml v DME bez sera. 0,75 ml podíl se smíchá s 20 μg DNA a přenese se do sterilní 0,4 cm elektroporační kyvety. Po 10 minutách se na buňky působí pulsem 200 voltů, 960 μF v jednotce BioRad Gene Pulser. Po dalších deseti minutách se buňky odstraní z kyvety a přidají se ke 20 ml DME obsahujícího 5 % FCS, 2 mM glutaminu, penicilin, streptomycin a gentamycin. Tato směs se rozdělí na stejné díly do čtyř 100 mm misek pro tkáňové kultury. Po 12 až 24 hodinách při 37 °C s 5 % oxidu uhličitého se médium nahradí podobným médiem, které obsahuje pouze 1 % FCS a v inkubaci se pokračuje dalších 72 hodin při 37 °C s 5 % CO_2. Potom se médium isoluje a testuje se na schopnost inhibovat syntézu IFN-τ.

Desetimililitrové podíly čerstvě isolovaných PBL (asi 2.10^6 buněk/ml) se inkubují při 37 °C s PHA (100 ng/ml) v médiu, které sestává z i) 90 % DME doplněného 5 % FCS a 2 mM glutaminu a ii) 10 % supernatantu z buněk COS 7 předem zpracovaných s pBCRF1(SRα). Po 24 hodinách se buňky a supernatanty isolují a testují se na přítomnost buď IFN-τ mRNA, nebo IFN-τ proteinu. Kontroly byly připraveny stejným způsobem až na to, že 10 % supernatantu z kultury COS 7 bylo předem transfektováno s plasmidem nesoucím nepříbuzný cDNA insert. vIL-10 - zpracované vzorky vykazovaly asi 50 % inhibici syntézy IFN-τ vzhledem ke kontrole.

Příklad 3

Exprese vIL-10 v Esherichia coli

Gen, který kóduje maturovaný vIL-10 uvedený v sekvenci identifikační číslo 4, může být expresován v E. coli.

cDNA insert pBCRF1(SRα) se reklonuje do plasmidu M13, kde se změní dvojitou místně řízenou mutagenesí: Nejdříve se vytvoří místo ClaI na 5'-konci kodující oblasti pro maturovaný vIL-10 polypeptid a potom se vytvoří místo BamHI na 3'-konci kodující oblasti pro maturovaný vIL-10 polypeptid. Mutovaná sekvence se pak ihned vloží do dále popsaného TRPC11 expresního vektoru.

Vektor TRPC11 se zkonstruuje ligací syntetického souhlasného RBS fragmentu s ClaI linkery (ATGCAT) a klonováním výsledných fragmentů do pMT11hc (který byl předem modifikován tak, aby obsahoval místo ClaI) rozštěpeného působením ClaI. PMT11hc je malý (2 300 párů nukleotidů) AMP^R, TET^R derivát plasmidu pBR322 o vysokém počtu kópií, který nese EcoRI-HindIII polylinkerovou oblast plasmidu πVX (πVX je popsán Maniatisem a spol.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Tento plasmid byl modifikován tak, aby obsahoval místo ClaI štěpením pMT11hc působením EcoRI a BamHI, doplněním výsledných přečnívajících konců a ligací s ClaI linkerem (CATCGATG). Obnoví se tak místa EcoRi a BamHI a místo SmaI se nahradí místem ClaI. Jeden transformant z konstrukce TRPC11 měl tandem RBS sekvence obklopený místy ClaI. Jedno z ClaI míst a část druhé kopie RBS sekvence se odstraní rozštěpením tohoto plamidu působením PstI, zpracováním s nukleasou Bal31, štěpením působením EcoRI a reakcí s T4 DNA polymerasou v přítomnosti všech čtyř deoxynukleotidtrifosfátů. Výsledné fragmenty o 30 až 40 párech nukleotidů byly isolovány PAGE a klonovány do pUC12 rozštěpeného působením SmaI. E. coli trpP-nesoucí EcoRI fragment o 248 párech nukleotidů odvozený od pKC101 (popsaný Nicholsem a spol. v Methods in Enzymology 101, str. 155 (Academic Press, N.Y. 1983) se pak klonuje do místa EcoRI. Doplní se tak konstrukce TRPC11, která je ilustrována na obrázku 2. TRPC11 se použije jako vektor pro vIL-10 nejdříve rozštěpením působením ClaI a BamHI, vyčištěním a potom smícháním ve standardním ligačním roztoku s ClaI–BamHI fragmentem M13 obsahujícím sekvenci nukleotidů kodující maturovaný BCRF1. TRPC11, který obsahuje insert, označený jako TRPC11-BCRF1, se množí v E. coli K12 kmen JM101, např. dostupném z ATCC pod číslem 33 876.

Příklad 4

Potlačení nádorů u myší účinkem IL-120

Vliv IL-10 na růst nádorů byl testován v testu podobném tomu, který popsal Tepper a spol.: Cell 57, 503 až 512 (1989). Stručně - tento test, jak je zde používán, zahrnuje oddělené injekční podání dvou skupin buněk syngenní nádorové buněčné linie myším; jedna skupina je stabilně trasfektována plasmidem expresujícím IL-10, druhá skupina znamená netransfektovanou kontrolu. Potom se srovná výskyt tvorby nádorů u myší, kterým byly injekčně podány buňky těchto dvou skupin.

Ve všech pokusech byly myším BALB/c injekčně podány buď transfektované, nebo netransfektované NS1 myelomové nádorové buňky, které jsou dostupné z ATCC pod číslem TIB 18. Buňky NS1 byly transfektovány elektroporací plasmidem pGSRG (ilustrovaným na obrázku 3) nesoucím otevřenou čtecí oblast (ORF) myšího IL-10, virového IL-10 nebo lidského IL-10 vloženou do restrikčního místa Xho I. pGSRG obsahuje marker pro stanovení stabilně

transfektovaných buněk NS1 a je derivátem pSVDtβ popsaným Schneem a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 6904 až 6908 (1987). IL-10 inserty pro pGSRG se získávají následujícím postupem. PCR primery obsahující sekvence EcoRI linkeru se připraví pro každý z plasmidů pH5C, pBCRF1 a pcD(SRα)-F115 tak, aby se ORF příslušných cDNA insertů mohly amplifikovat. Amplifikované ORF se reklonují do pcD(SRα) vektorů rozštěpených působením EcoRI a odděleně se expresují tak, aby se vybraly vektory, které obsahují ORF se správnou orientací. A konečně se XhoI fragmenty plasmidu pcD(SRα) reklonují do příslušných pGSRG plasmidů rozpuštěných působením XhoI.

Buňky NS1 se transfektují plasmidem pGSRG následujícím způsobem. Buňky (2 až 3.10^6) z polokonfluentní 100 mm Petriho misky se odstřeďují, promyjí se jednou 10 ml sterilního fosforečnanem pufrovaného sterilního solného roztoku (PBS), odstřeďují a resuspendují v 0,5 ml PBS. V 1 ml PBS se suspenduje 20 až 100 μg plasmidové DNA. Buňky se smíchají s DNA, umístí se do kyvety v ledu a elektricky se na ní působí šoky v zařízení Bio-Rad gene Pulser nastaveném na kapacitu 960 mikrofardů a 200 až 300 voltů. Po deseti minutách v ledu se buňky vysejí na standardní mikrotitrovací desku s 96 jamkami v objemu 100 μl. Po 48 až 78 hodinách se do každé jamky přidá 100 μl selekčního média s mykofenolovou kyselinou (0,5 μg/ml mykofenolové kyseliny, 100 μg na ml xanthinu, 15 μg/ml hypoxanthinu, 12 až 15 % plodového telecího séra, 600 μg/ml glutaminu v DME High glukose).

V prvním pokusu se intraperitoneální injekcí 4, 3, 4 a myším podá 5.10^6 netransformovaných buněk (kontrola), pGSRG-mIL10-transformovaných buněk, pGSRG-vIL10-transformovaných buněk a pGSRG-hIL10-transformovaných buněk. Po čtyřech týdnech se třem ze čtyř kontrolních myší vyvinuly viditelné nádory. U žádné z pokusných myší se nevyvinuly nádory během 4 týdnů.

V druhém pokusu se intraperitoneální injekcí 16 myším podá 5.10^6 netransformovaných buněk a 15 myším se intraperitoneálně podá 5.10^6 pGSRG-mIL10-transformovaných buněk. Po dvou týdnech se osmi kontrolním myším znovu injekčně podá 5.10^6 netransformovaných buněk a 7 z 15 myší 5.10^6 pGSGR-mIL10-transformovaných buněk. Po čtyřech týdnech od původních injekcí se myši zkoumají na přítomnost vývoje nádorů. U 16 ze 16 kontrolní myší, byly vyvinuty viditelné nádory. U žádné z pokusných myší se nevyvinuly žádné známky nádorů.

Popisy předcházejících uspořádání podle vynálezu jsou zde popsány pro účely ilustrace a popisu. Nejsou zamýšleny jako vyčerpávající nebo jako omezující tento vynález na přesné zde popsané formy. Je zřejmé, že vedle shora uvedeného popisu existuje mnoho modifikací a variací. Tato uspořádání byla vybrána a popsána, aby nejlépe vysvětlila principy tohoto vynálezu, a tím umožnila jiným zručným odborníkům co nejlépe využít vynález v různých uspořádáních a s různými modifikacemi podle toho, jak je toho potřeba. Rozsah vynálezu je definován připojenými body patentových nároků.

Žadatelé uložili kultury E. coli MC1061 nesoucí pH5C, pH15C a pBCRF(SRα) v Americké sbírce typů kultur (American Type Culture Collection), Rockville, Md., USA (ATCC) pod čísly 68 191, 68 192 a 68 193. Tato uložení byla provedena za podmínek stanovených ATCC dohodou o ukládání kultur pro patentové účely, podle které se zajišťuje, že uložení budou dostupná USA úřadu pro patenty a ochranné známky podle 35 USC 122 a 37 CFR 1.14 a budou veřejně dostupná po vydání USA patentu, což vyžaduje, aby tato uložení byla uchovávána. Dostupnost uloženého kmene není konstruována jako licence k praktickému využívání vynálezu v rozporu s právy garantovanými autoritou jakékoliv vlády v souladu s jejími patentovými nároky.

V následující části tohoto spisu je uveden seznam sekvencí.

Sekvence identifikační číslo: 1
Typ sekvence: aminokyselinová
Délka sekvence: 178 zbytků aminokyselin
Druh vlákna: jednovláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: protein

Původní zdroj (organismus): člověk

Vlastnosti: lidský IL-10 (lidský inhibiční faktor syntézy cytokinu, lidský CSIF)

Met	His	Ser	Ser	Ala	Leu	Leu	Cys	Cys	Leu	Val	Leu	Leu	Thr	Gly	
				5					10					15	
Val	Arg	Ala	Ser	Pro	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Asn	Ser	Cys	
				20					25					30	
Thr	His	Phe	Pro	Gly	Asn	Leu	Pro	Asn	Met	Leu	Arg	Asp	Leu	Arg	
				35					40					45	
Asp	Ala	Phe	Ser	Arg	Val	Lys	Thr	Phe	Phe	Gln	Met	Lys	Asp	Gln	
				50					55					60	
Leu	Asp	Asn	Leu	Leu	Leu	Lys	Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Phe	Lys	
				65					70					75	
Gly	Tyr	Leu	Gly	Cys	Gln	Ala	Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Phe	Tyr	
				80					85					90	
Leu	Glu	Glu	Val	Met	Pro	Gln	Ala	Glu	Asn	Gln	Asp	Pro	Asp	Ile	
				95					100					105	
Lys	Ala	His	Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg	
				110					115					120	
Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Cys	His	Arg	Phe	Leu	Pro	Cys	Glu	Asn	Lys	
				125					130					135	
Ser	Lys	Ala	Val	Glu	Gln	Val	Lys	Asn	Ala	Phe	Asn	Lys	Leu	Gln	
				140					145					150	
Glu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Lys	Ala	Met	Ser	Glu	Phe	Asp	Ile	Phe	Ile	
				155					160					165	
Asn	Tyr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Met	Thr	Met	Lys	Ile	Arg	Asn			
				170					175						

Sekvence identifikační číslo: 2

Typ sekvence: aminokyselinová
Délka sekvence: 170 zbytků aminokyselin
Druh vlákna: jednovláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: protein
Vlastnosti: virový IL-10 (BCRF1)

Met	Glu	Arg	Arg	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Gln	Cys	Leu	Val	Leu	Leu
				5					10					15
Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Cys	Gly	Gly	Thr	Asp	Gln	Cys	Asp	Asn	Phe
				20					25					30
Pro	Gln	Met	Leu	Arg	Asp	Leu	Arg	Asp	Ala	Phe	Ser	Arg	Val	Lys
				35					40					45

Thr	Phe	Phe	Gln	Thr	Lys	Asp	Glu	Val	Asp	Asn	Leu	Leu	Leu	Lys
				50					55					60
Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Phe	Lys	Gly	Tyr	Leu	Gly	Cys	Gln	Ala
				65					70					75
Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Phe	Tyr	Leu	Glu	Glu	Val	Met	Pro	Gln
				80					85					90
Ala	Glu	Asn	Gln	Asp	Pro	Glu	Ala	Lys	Asp	His	Val	Asn	Ser	Leu
				95					100					105
Gly	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Cys	His
				110					115					120
Arg	Phe	Leu	Pro	Cys	Glu	Asn	Lys	Ser	Lys	Ala	Val	Glu	Gln	Ile
				125					130					135
Lys	Asn	Ala	Phe	Asn	Lys	Leu	Gln	Glu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Lys	Ala
				140					145					150
Met	Ser	Glu	phe	Asp	Ile	Phe	Ile	Asn	Tyr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Met
				155					160					165
Thr	Ile	Lys	Ala	Arg										
				170										

Sekvence identifikační číslo: 3

Typ sekvence:aminokyselinová
Délka sekvence: 160 zbytků aminokyselin
Druh vlákna: jednovláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: protein
Původní zdroj (organismus): člověk
Vlastnosti: maturovaný lidský IL-10 (maturovaný lidský CSIF)

Ser	Pro	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Asn	Ser	Cys	Thr	His	Phe
				5					10					15
Pro	Gly	Asn	Leu	Pro	Asn	Met	Leu	Arg	Asp	Leu	Arg	Asp	Ala	Phe
				20					25					30
Ser	Arg	Val	Lys	Thr	Phe	Phe	Gln	Met	Lys	Asp	Gln	Leu	Asp	Asn
				35					40					45
Leu	Leu	Leu	Lys	Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Phe	Lys	Gly	Tyr	Leu
				50					55					60
Gly	Cys	Gln	Ala	Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Phe	Tyr	Leu	Glu	Glu
				65					70					75
Val	Met	Pro	Gln	Ala	Glu	Asn	Gln	Asp	Pro	Asp	Ile	Lys	Ala	His
				80					85					90
Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu
				95					100					105
Arg	Arg	Cys	His	Arg	Phe	Leu	Pro	Cys	Glu	Asn	Lys	Ser	Lys	Ala
				110					115					120
Val	Glu	Gln	Val	Lys	Asn	Ala	Phe	Asn	Lys	Leu	Gln	Glu	Lys	Gly
				125					130					135
Ile	Tyr	Lys	Ala	Met	Ser	Glu	Phe	Asp	Ile	Phe	Ile	Asn	Tyr	Ile
				140					145					150
Glu	Ala	Tyr	Met	Thr	Met	Lys	Ile	Arg	Asn					
				155					160					

Sekvence identifikační číslo: 4

Typ sekvence: aminokyselinová
Délka sekvence: 147 zbytků aminokyselin
Druh vlákna: jednovláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: protein
Vlastnosti: virový IL-10 (BCRF1)

Thr	Asp	Gln	Cys	Asp	Asn	Phe	Pro	Gln	Met	Leu	Arg	Asp	Leu	Arg
				5					10					15
Asp	Ala	Phe	Ser	Arg	Val	Lys	Thr	Phe	Phe	Gln	Thr	Lys	Asp	Glu
				20					25					30
Val	Asp	Asn	Leu	Leu	Leu	Lys	Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Phe	Lys
				35					40					45
Gly	Tyr	Leu	Gly	Cys	Gln	Ala	Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Phe	Tyr
				50					55					60
Leu	Glu	Glu	Val	Met	Pro	Gln	Ala	Glu	Asn	Gln	Asp	Pro	Glu	Ala
				65					70					75
Lys	Asp	His	Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg
				80					85					90
Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Cys	His	Arg	Phe	Leu	Pro	Cys	Glu	Asn	Lys
				95					100					105
Ser	Lys	Ala	Val	Glu	Gln	Ile	Lys	Asn	Ala	Phe	Asn	Lys	Leu	Gln
				110					115					120
Glu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Lys	Ala	Met	Ser	Glu	Phe	Asp	Ile	Phe	Ile
				125					130					135
Asn	Tyr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Met	Thr	Ile	Lys	Ala	Arg			
				140					145					

Sekvence identifikační číslo: 5

Typ sekvence: nukleotid
Délka sekvence: 15 nukleotidů
Druh vlákna: jednovláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: DNA
Bezprostřední experimentální zdroj: syntetická (komerční, Pharmacia)
Vlastnosti: dvojvlákonový fragment kodující souhlasné ribosomové vazebné místo

GTAAGGAGGT TTAAC

Sekvence identifikační číslo: 6

Typ sekvence: nukleotid
Délka sekvence: 56 párů nukleotidů s přečnívajícím koncem se 4 nukleotidy
Druh vlákna: dvouvláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: DNA
Bezprostřední experimentální zdroj: syntetická
Charakteristika: malá písmena znamenají, že nukleotid se liší od nukleotidů přírodní sekvence ve stejném místě

Vlastnosti: fragment 1A/B syntetického CSIF genu

```
AGCCCAGGCC AGGGCACCCA GTCTGAGAAC AGCTGCACCC ACTTCCCAGG      50
TCGGGTCCGG TCCCGTGGGT CAGACTCTTG TCGACGTGGG TGAAGGGTCC

tAACCggtac                                                  60
aTTGGc
```

Sekvence identifikační číslo: 7

Typ sekvence: nukleotid
Délka sekvence: 48 párů nukleotidů s přečnívajícími konci s 5 a 9 nukleotidy
Druh vlákna: dvouvláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: DNA
Bezprostřední experimentální zdroj: syntetická
Charakteristika: malá písmena znamenají, že nukleotid se liší od nukleotidu přírodní sekvence ve stejném místě
Vlastnosti: fragment 2A/B syntetického CSIF genu

```
GtAACCTGCC TAACATGCTT CGAGATCTCC GAGATGCCTT CAGCAGAGTG      50
     GACGG ATTGTACGAA GCTCTAGAGG CTCTACGGAA GTCGTCTCAC

AAGACTTTCT TT                                               62
TTC
```

Sekvence identifikační číslo: 8

Typ sekvence: nukleotid
Délka sekvence: 35 párů nukleotidů s přečnívajícím koncem s 9 nukleotidy
Druh vlákna: dvouvláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: DNA
Bezprostřední experimentální zdroj: syntetická
Charakteristika: malá písmena znamenají, že nukleotid se liší od nukleotidu přírodní sekvence ve stejném místě.
Vlastnosti: fragment 3A/B syntetického CSIF genu

```
          C AAATGAAGGA TCAGCTGGAC AACTTGTTcT  tAAG            35
TGAAAGAAAG TTTACTTCCT AGTCGACCTG TTGAACAAgA  aTTC
```

Sekvence identifikační číslo: 9

Typ sekvence: nukleotid
Délka sekvence: 69 párů nukleotidů s přečnívajícím koncem se 4 nukleotidy
Druh vlákna: dvouvláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: DNA
Bezprostřední experimentální zdroj: syntetická
Charakteristika: malá písmena znamenají, že nukleotid se liší od nukleotidu přírodní sekvence ve stejném místě

Vlastnosti: fragment 4A/B syntetického CSIF genu

```
GAGTCCTTGC TGGAGGACTT TAAGGGTTAC CTGGGTTGCC AAGCCTTGTC      50
CTCAGGAACG ACCTCCTGAA ATTCCCAATG GACCCAACGG TTCGGAACAG

TGAGATGATC CAGTTTTAt                                        69
ACTCTACTAG GTCAAAATaG AtC
```

Sekvence identifikační číslo: 10

Typ sekvence: nukleotid
Délka sekvence: 61 párů nukleotidů s přečnívajícím koncem se 4 nukleotidy
Druh vlákna: dvouvláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: DNA
Bezprostřední experimentální zdroj: syntetická
Charakteristika: malá písmena znamenají, že nukleotid se liší od nukleotidu přírodní sekvence ve stejném místě
Vlastnosti: fragment 5A/B syntetického CSIF genu

```
CTaGAGGAGG TGATGCCCCA AGCTGAGAAC CAAGACCCAG ACATCAAGGC      50
GAtCTCCTCC ACTACGGGGT TCGACTCTTG GTTCTGGGTC TGTAGTTCCG

GCATGTtAAC g                                                61
CGTACAaTTG cagct
```

Sekvence identifikační číslo: 11

Typ sekvence: nukleotid
Délka sekvence: 61 párů nukleotidů s přečnívajícím koncem se 4 nukleotidy
Druh vlákna: dvouvláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: DNA
Bezprostřední experimentální zdroj: syntetická
Charakteristika: malá písmena znamenají, že nukleotid se liší od nukleotidu přírodní sekvence ve stejném místě
Vlastnosti: fragment 6A/B syntetického CSIF genu

```
AACTCCCTGG GGGAGAACCT GAAGACCCTC AGGCTGAGGC TACGGCGCTG      50
TTGAGGGACC CCCTCTTGGA CTTCTGGGAG TCCGACTCCG ATGCCGCGAC

TCATCGATct gca                                              63
AGTAGCTAg
```

Sekvence identifikační číslo: 12

Typ sekvence: nukleotid
Délka sekvence:
Druh vlákna: dvouvláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: DNA
Bezprostřední experimentální zdroj: syntetická

Charakteristika: malá písmena znamenají, že nukleotid se liší od nukleotidů přírodní sekvence ve stejném místě
Vlastnosti: fragment 7A/B syntetického CSIF genu

```
CGATTTCTTC CCTGTCAAAA CAAGAGCAAG GCCGTGGAGC AGGTGAAGAA        50
  TAAAGAAG GGACAGTTTT GTTCTCGTTC CGGCACCTCG TCCACTTCTT

cGCgTgcatg                                                    60
gCGcAc
```

Sekvence identifikační číslo: 13

Typ sekvence: 45 párů nukleotidů s přečnívajícími konci se 4 a 9 nukleotidy
Druh vlákna: dvouvláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: DNA
Bezprostřední experimentální zdroj: syntetická
Charakteristika: malá písmena znamenají, že nukleotid se liší od nukleotidu přírodní sekvence ve stejném místě
Vlastnosti: fragment 8A/B syntetického CSIF genu

```
CGCGTTTATT AATAAGCTCC AAGACAAAGG CATCTACAAA GCCATGAGTG        50
    AAATTA TTATTCGAGG TTCTGTTTCC GTAGATGTTT CGGTACTCA

AGTTTGAC                                                      58
```

Sekvence identifikační číslo: 14

Typ sekvence: nukleotid
Délka sekvence: 51 párů nukleotidů s přečnívajícími konci s 9 a 4 nukleotidy
Druh vlákna: dvouvláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: DNA
Bezprostřední experimentální zdroj: syntetická
Charakteristika: malá písmena znamenají, že nukleotid se liší od nukleotidu přírodní sekvence ve stejném místě.
Vlastnosti: fragment 9A/B syntetického CSIF genu

```
          A TCTTCATCAA CTACATAGAA GCCTACATGA CAATGAAGAT        50
CTCAAACTGT AGAAGTAGTT GATGTATCTT CGGATGTACT GTTACTTCTA

ACGAAACTGA                                                    60
TGCTTTGACT tcga
```

Sekvence identifikační číslo: 15

Typ sekvence: nukleotid
Délka sekvence: 499 nukleotidů
Druh vlákna: jednovláknová
Topologie: lineární
Typ molekuly: DNA
Vlastnosti: koduje virový IL-10

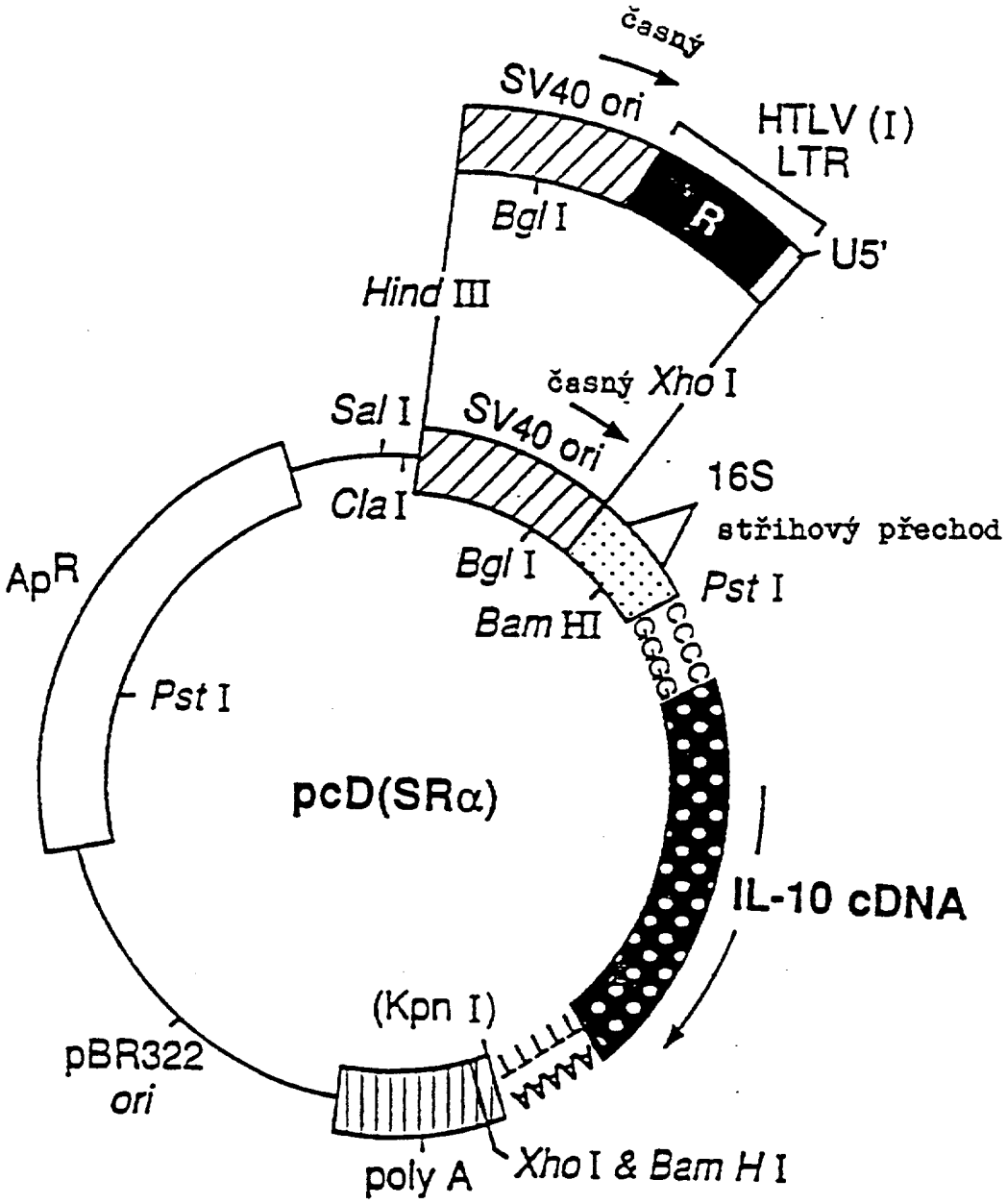
```
AATTC ATG GAG CGA AGG TTA GTG GTC ACT CTG CAG TGC CTG GTG      44
CTG CTT TAC CTG GCA CCT GAG TGT GGA GGT ACA GAC CAA TGT       86
GAC AAT TTT CCC CAA ATG TTG AGG GAC CTA AGA GAT GCC TTC      128
AGT CGT GTT AAA ACC TTT TTC CAG ACA AAG GAC GAG GTA GAT      170
AAC CTT TTG CTC AAG GAG TCT CTG CTA GAG GAC TTT AAG GGC      212
TAC CTT GGA TGC CAG GCC CTG TCA GAA ATG ATC CAA TTC TAC      254
CTG GAG GAA GTC ATG CCA CAG GCT GAA AAC CAG GAC CCG GAG      296
GCT AAG GAC CAT GTC AAT TCT TTG GGT GGA AAT CTA AAG ACC      338
CTA CGG CTC CGC CTG CGC AGG TGC CAC AGG TTC CTG CCG TGT      380
GAG AAC AAG AGT AAA GCT GTG GAA CAG ATA AAA AAT GCC TTT      422
AAC AAG CTG CAG GAA AAA GGA ATT TAC AAA GCC ATG AGT GAA      464
TTT GAC ATT TTT ATT AAC TAC ATA GAA GCA TAC ATG ACA ATT      506
AAA GCC AGG TGA G                                           519
```

PATENTOVÉ NÁROKY

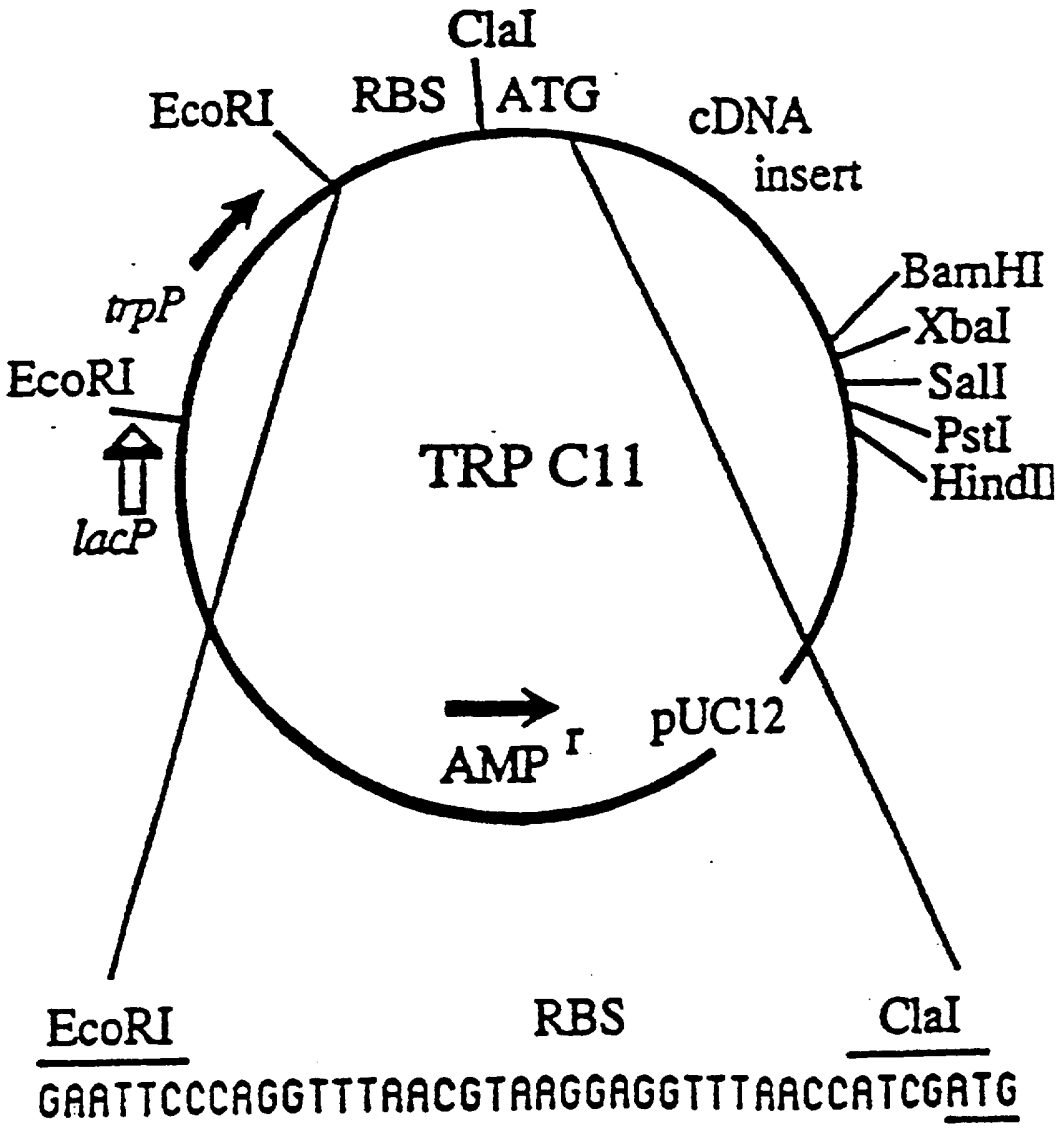
1. Použití lidského interleukinu-10 nebo virového interleukinu-10 pro výrobu léčiva pro léčení nádorů u pacienta.

2. Farmaceutický prostředek pro léčení nádorů, **vyznačující se tím,** že obsahuje jako aktivní složku lidský interleukin-10 nebo virový interleukin-10 spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem nebo excipientem.

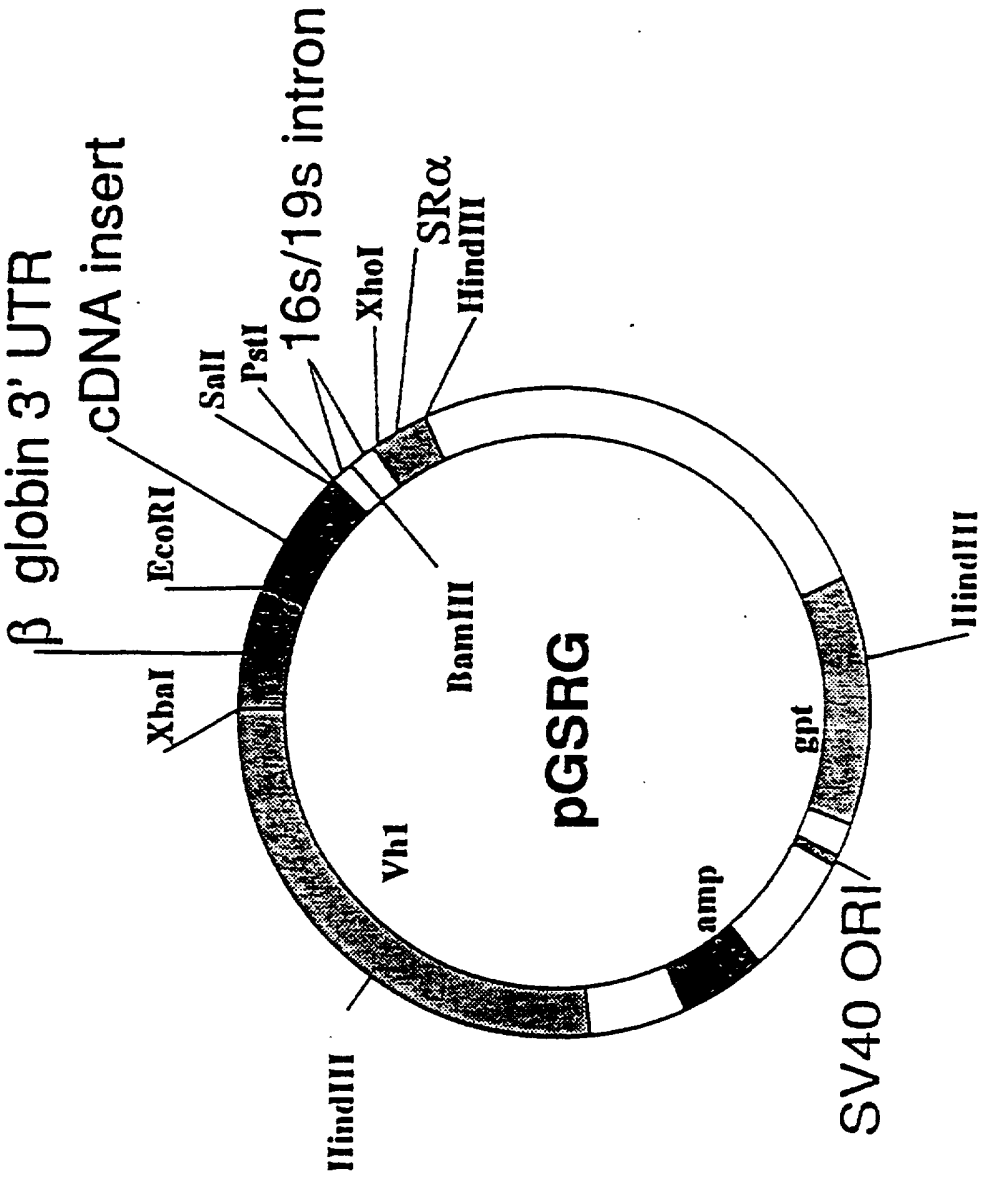
3 výkresy


časný
SV40 ori
HTLV (I)
LTR
R
U5'
Bgl I
Hind III
časný
Xho I
Sal I
SV40 ori
16S
střihový přechod
Cla I
Bgl I
Pst I
ApR
Bam HI
CCCC
GGGG
Pst I
pcD(SRα)
IL-10 cDNA
(Kpn I)
pBR322
ori
TTTTT
AAAAA
poly A
Xho I & Bam H I

Obrázek 1


ClaI
RBS
ATG
EcoRI
cDNA
insert
BamHI
XbaI
SalI
PstI
HindII
trpP
EcoRI
lacP
TRP C11
AMP r
pUC12
EcoRI
RBS
ClaI
GAATTCCCAGGTTTAACGTAAGGAGGTTTAACCATCGATG

Obrázek 2



Obrázek 3

Konec dokumentu