

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 843384 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **843384**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C12P

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **28.08.1984**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **28.08.1984**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **01.03.1985**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etuoiikeus - Prioritet - Priority

30.08.1983 DE P_33_31_108.0 10.05.1984 DE P_3417277.7

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Boehringer Ingelheim International GmbH, Postfach 200, 55216 Ingelheim am Rhein, SAKSA, (DE)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Adolf, Günther, Österreich, ITÄVALTA, (AT)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Leitzinger Oy, High Tech Center, Tammasaarenkatu 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Lymfotoksiinin ja lymfotoksiini-mRNA:n valmistusmenetelmä.

Förfarande för framställning av lymfotoxin och lymfotoxin-mRNA.

Lymfotoksiinin ja lymfotoksiini-mRNA:n valmistusmenetelmä. -
Förfarande för framställning av lymfotoxin och lymfotoxin-mRNA.

Kirjallisuudesta tiedetään, että tietyt imettäväisten solut voivat sopivan ärsytyksen jälkeen tuottaa in vitro nk. lymfotoksiineja (kts. esim. Evans, Cancer Immunol. Immunother. 12, 181-190 (1983) ja Granger et al., Biology of the Lymphokines sivut 141-180, Academic Press 1979). Tietyn lajin lymfotoksiini in vitro ei tällöin ole yhtenäinen proteiini, vaan pikemminkin sitä voidaan kuvata joukkona subtyyppejä, jotka eroavat toisistaan molekyylipainon, varauksen ja stabiilisuuden suhteen (kts. esimerkiksi Granger et al., Biology of the Lymphokines s. 14-180, Academic Press 1979). Ihmisellä erotetaan esimerkiksi neljä lymfotoksiiniluokkaa, joiden molekyylipainot ovat alueella 10.000 - 20.000 (LT), 35.000 - 50.000 (LT), 70.000 - 90.000 (LT) ja 200.000 - 600.000 (LT-kompleksi).

In vitro lymfotoksiinit kykenevät

a) estämään solujen pahanlaatuisen transformaation (kts. Evans et al., Int. J. Cancer 27, 45-49 (1981) ja Ransom et al., J. Natl. Cancer Inst. 69, 741-744 (1982)),

b) vaikuttamaan tuumorisoluihin sytostaattisesti tai jopa sytolyyttisesti (kts. Evans et al., Immunopharmacology 3, 347-359 (1981)) ja

c) lisäämään tuumorisolujen herkkyyttä organismin sellulaarisen immuno-torjuntajärjestelmän suhteen (kts. Evans et al., Cell. Immunol. 63, 1-15 (1981) ja Ransom et al., Int. J. Cancer 29, 451-458 (1982)).

Kirjallisuudesta tiedetään lisäksi, että lymfotoksiini-valmisteet voivat eläinmallissa aiheuttaa myös tuumorien regressoitumista (kts. Khan et al., Proc. Soc. Exptl. Biol.

Med. 169, 291-294 (1982)). Lymfotoksiineilla on siten suuri merkitys malignien sairauksien profylaksiassa ja terapiassa.

Tähän asti tunnetuissa lymfotoksiinien talteenottomenetelmissä lähdetään useimmissa tapauksissa primäärisistä soluista, esimerkiksi ihmisen periferiaverestä tai kitarisoista saaduista leukosyyttivalmisteista (kts. Williams et al., J. Immunol. 130, 518-520 (1983)), hiirten pernasoluista (kts. Aksamit et al., Infect. Immun. 36, 1028-1035 (1982) ja Trivers et al., J. Immunol. 117, 130-135 (1976)) tai leukosyyteistä, jotka on saatu syyrialalaisten hamstereiden tai marsujen vatsaontelosta (kts. esim. Evans et al., Int. J. Cancer 27, 45-49 (1981)). Lymfosyyttien tuottamiseksi on tällöin näitä soluja ensin kiihotettava inkuboimalla suurimolekyylisten mitogeenien, esimerkiksi fytohemaglutiniinin kanssa. B-lymfosyytti-solulinjojen viljelysupernatanteissa on tähän mennessä voitu todeta vain alhaisia lymfotoksiini-aktiivisuuksia (kts. Granger et al., J. Immunol. 104, 1476 (1970) ja Amino et al., J. Immunol. 113, 1334-1345 (1974)).

Koska tähän mennessä käytetyillä lymfotoksiinien valmistusmenetelmillä on voitu valmistaa vain vähäisiä määriä ja vain jokseenkin epäpuhtaana, tähän mennessä valmistettuja lymfotoksiineja ei ole voitu puhdistaa homogeenisiksi eikä käyttää riittäviä määriä suoritettaessa laajoja tutkimuksia neoplastisesta vaikutuksesta eläinmallilla. Sitä paitsi tähän mennessä ei ole myöskään voitu osoittaa mitään biologisesti aktiivista lymfotoksiini-mRNA; tämä on kuitenkin edellytys lymfotoksiini-geenin molekyylikloonaukselle geeniteknologian menetelmillä.

Esillä olevan keksinnön tavoitteena on siten valmistaa riittäviä määriä ja riittävän puhtaina lymfotoksiinia sekä lymfotoksiini-mRNA.

Keksinnön mukaisesti on nyttemmin havaittu, että apinoiden, erityisesti Saguinus-suvun apinoiden nk. T-lymfosyytti-

tyyppiset solut, esimerkiksi solulinjat L-77/5, A651, A2543, 7DN2, 1022 ja 1670, parhaiten kuitenkin solulinjat 1022 ja 1670, jotka on transformoitu in vitro tai in vivo infektoimalla viruksilla, parhaiten Herpes-viruksilla, kuten Herpes virus saimiri tai Herpes virus ateles, ja jotka on saatu pysyvästi kasvamaan viljelmässä, tuottavat huomattavia määriä lymfotoksiinia ja lymfotoksiini-mRNA sopivassa viljelymediumissa spontaanisti, so. ilman muuta induktiota.

Edelleen on havaittu, että lisäämällä viljelymediumiin nk. stimulaattoria, esimerkiksi kirjallisuudesta tunnettua tuumoripromoottoria, kuten diterpeni-johdosta, parhaiten Tiglian- tai Daphnan-tyyppistä, esimerkiksi metsereiiniä tai forbolin esteriä, parhaiten 12-O-tetradekanoyyliforboli-13-asetaattia (kts. Diamond et al., Advances in Cancer Research Vol. 32, sivut 1-74, Academic Press 1980 ja Hecker, Carcinogenesis Vol. II, Mechanisms of Tumor Promotion and Cocarcinogenesis, sivut 11-48, Raven Press, New York 1978), konsentraatiossa 1-1000 ng/ml, lymfotoksiinin ja lymfotoksiini-mRNA:n tuotto edelleen kasvaa.

Viljelymediumina tulevat tällöin kysymykseen tavanomaiset seerumia sisältämättömät ja seerumipitoiset viljelymediumit, esimerkiksi Eagle's Minimum Essential Medium tai Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI1640), joihin kulloinkin voidaan lisätä vasikansikiöseerumia ja antibiootteja, parhaiten 10 % asti vasikansikiöseerumia, penisilliiniä ja streptomysiiniä.

Lymfotoksiiniproteiineja tuotettaessa suoritetaan keksinnön mukainen menetelmä parhaiten siten, että transformoituja soluja, joihin on lisätty 10 - 100 ng/ml 12-O-tetradekanoyyliforboli-13-asetaattia tai metsereiiniä stimulaattorina, pidetään seerumipitoisessa, määrättyissä olosuhteissa myös seerumia sisältämättömässä viljelymediumissa, esimerkiksi RPMI 1640 mediumissa, 1 - 7 päivää, parhaiten kuitenkin 3 - 4 päivää ja sen jälkeen näin muodostunut lymfotoksiini

sinänsä tunnetuilla menetelmillä erotetaan viljelysupernatantista, väkevöidään ja puhdistetaan. Tämä menetelmä kuitenkin suoritetaan erityisen edullisesti siten, että seerumipitoisessa mediumissa alkaneen lisääntymisen jälkeen solut siirretään vähäseerumiseen, parhaiten kuitenkin seerumittomaan mediumiin.

Lymfotoksiini-mRNA tuotettaessa suoritetaan keksinnön mukainen menetelmä parhaiten siten, että transformoituja soluja, joihin on lisätty 10 - 100 ng/ml 12-O-tetra-dekanoyyliforboli-13-asetaattia tai metseriiniä stimulaattorina, inkuboidaan seerumipitoisessa viljelymediumissa, esimerkiksi RPMI1640 mediumissa, jossa on 10 % vasikansikiöseerumia, 6 - 48 tuntia, parhaiten 12 - 24 tuntia, minkä jälkeen solut erotetaan ja näiden hajottamisen jälkeen mRNA eristetään sinänsä tunnetuilla menetelmillä.

Näin muodostettuja soluviljelytuotteita eristettäessä on näin saadun lymfotoksiinin puhdistamisessa osoittautunut erityisen sopivaksi huokoskontrolloidulla lasilla tapahtuva kromatografia, jota käytetään ensin, ja solukalvojen hajottamisen ja solutumien poistamisen jälkeen, lymfotoksiini-mRNA:n uuttaminen esimerkiksi fenolilla.

Lymfotoksiini puhdistetaan edelleen esimerkiksi HPLC-menetelmällä.

Näin saatu lymfotoksiini, jonka molekyyllipaino on $60.000 \pm 15 \%$, sopii tuumorisolujen profylaksiaan ja torjuntaan, esimerkiksi isotonisessa vesiliuoksessa.

Tekniikan tasoon nähden on keksinnön mukaisella menetelmällä seuraavat edut:

1. Käytetään elinkyvyltään rajoittamatonta homogeenista solupopulaatiota, jota voidaan suurentaa mielivaltaisessa mitassa.

2. Lymfotoksiinin tuottaminen näissä viljelmissä tapahtuu spontaanisti, so. mitään suurimolekyyllisiä mitogeenejä ei tarvitse lisätä.

3. Lymfotoksiinin tuottoa voidaan vielä lisätä pienimolekyyllisillä stimulaattoreilla.

4. Lymfotoksiinin tuottaminen voi tapahtua suurilla saannoilla seerumia sisältämättömässä mediumissa; tällä tavoin saadaan erinomainen lähtöaine proteiinikemialliseen jatkopuhdistukseen ja

5. Soluista eristetyllä RNA:lla on välittömästi osoitettava lymfotoksiini-mRNA-aktiivisuus, ja se on siten erinomainen lähtöaine tämän RNA:n rikastamiseen edelleen, mikä taas on oleellinen edellytys mRNA:n molekyylikloonaukselle. Kloonattua apinan lymfotoksiini-mRNA voidaan taas käyttää tunnetuilla menetelmillä koettimena homologisen humaani-lymfotoksiini-mRNA:n tai vastaavan geenin eristämisessä.

Pois

Seuraavat esimerkit selventävät esillä olevaa keksintöä sitä kuitenkaan rajoittamatta.

Esimerkki 1

Lymfotoksiinin tuottaminen Herpes-viruksilla transformoiduilla apinan T-lymfosyytti-solulinjoilla

Käytettyjä lyfmoidisia solulinjoja pidettiin Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI 1640) mediumissa, johon oli lisätty 10 % vasikansikiöseerumia, penisilliiniä ja streptomysiiniä, stationääriviljelmässä 37°C:ssa kaasukehässä, jossa oli 95 % ilmaa ja 5 % hiilidioksidia, ja laimennettiin kolme kertaa viikossa uudella mediumilla. Sakeat viljelmät laimennettiin kaikissa kokeissa uudella mediumilla 1:2 - 1:3, seuraavana päivänä laimennettiin

vielä 1:3 ja kulloinkin laitettiin 5 ml viljelypulloihin. 3 päivän kuluttua viljelysupernatantit otettiin talteen sentrifugoimalla, pakastettiin ja varastoitiin -20°C:ssa kokeeseen asti.

Seuraavassa taulukossa on annettu jokaisen solulinjan kolmessa eri viljelysupernatantissa saadut lymfotoksiini-aktiivisuudet:

Solulinja Alkuperä

(transformatio Herpes-virus = HV)

Viite Lymfotoksiinivaikuttavuus

RE/ml

Koe 1 Koe 2 Koe 3

L-77/5	Saguinus oedipus - Tuumorillisen eläimen imusolmukkeet (HV saimiri)	A	1	3	1				
A 651	Saguinus oedipus - lymfositien in vitro transformatio (HV ateles)	B	15	30	25				
A 2543	Saguinus oedipus - lymfositien in vitro transformatio (HV ateles)	B	90	56	48				
70N2	Saguinus oedipus - tuumorillisen eläimen kateenkorva (HV saimiri)	A, C, D, E	56	47	50				
1022	Saguinus oedipus - tuumori (HV ateles)	D	580	480	630				
1670	Saguinus nigricollis - tuumorillisen eläimen perna (HV saimiri)	A, C, E	88	83	77				

Viitteet:

- A = Fleckenstein et al., Int. J. Cancer 19, 546-554 (1977)
- B = Abb et al., Cancer Immunol. Immunother. 9, 219-226 (1980)
- C = Falk et al., Bacteriol. Proc. 38, 191 (1972)
- D = Johnson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 6391-6395 (1981)
- E = Kaschka-Dierich et al., J. Virol. 44, 295-310 (1982)
- Yleisartikkeli: Fleckstein, Biochem. Biophys. Acta 560, 301-342 (1979)

Suurten solumäärien tuottamiseen käytettiin liikkuvia viljelmiä stationääriviljelmien asemesta. Tätä varten soluja (esimerkiksi linja 1670) kasvatettiin esimerkiksi RPMI 1640-mediumissa, johon oli lisätty 10 % vasikansikiöseerumia, 1- tai 2-litran Erlenmeyerpulloissa pyörivässä ravistelijassa (0,5 l viljelmää 1 l pullossa; 1 l viljelmää 2 l pullossa; 40 kierrosta minuutissa; 37°C normaalissa ilmakehässä) ja laimennettiin kolme kertaa viikossa uudella viljelymediumilla suhteessa 1:2 - 1:3. Tällä tavoin on mahdollista valmistaa viljelysupernatanttia viikossa suuruusluokkaa 10 - 100 l.

Lymfotoksiinin tuotto 1670-soluissa oli stabiili pitkän aikaa: 9 kuukauden jatkuvan viljelyn jälkeen ei viljelysupernatanteissa voitu havaita merkittävää lymfotoksiiniaktiivisuuden laskua.

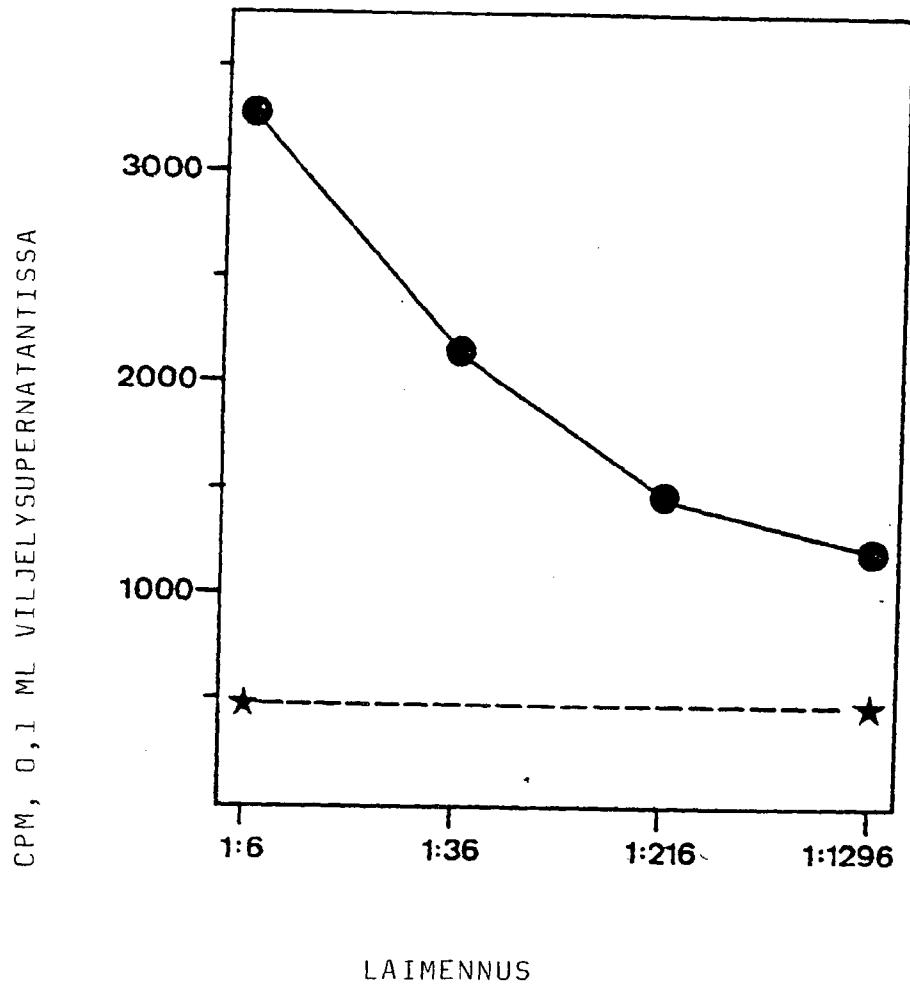
Lymfotoksiinin karakterisointi:

a) Lymfotoksiini-aktiivisuuden biologiseen osoittamiseen

käytettiin seuraavaa osoitusmenetelmää (modifioitu Trivers et al. mukaisesti, J. Immunol. 117, 130-135 ja Evans: Cell. Immunol. 63, 1-15 (1981)):

Hiiren transformoituja solulinjan L929 soluja viljeltiin yön yli 1 mikroCurie 3H-tymidiini/ml viljelymediumissa, parhaiten Eagle's Minimum Essential Medium, jossa 10 % vasikansikiöseerumia), sen jälkeen trypsinoitiin ja suspendoitiin uuteen viljelymediumiin, jossa oli 5 % vasikansikiöseerumia. Viljelymaljoihin (halkaisija 16 mm) pipetoitiin kuhunkin tätä suspensiota 0,5 ml, missä oli noin 30.000 solua, ja inkuboitiin 3 - 6 tuntia. Sen jälkeen testattavat näytteet sarjalaimennettiin ja inkuboitiin 3 päivää (kaikki inkuboinnit 37°C:ssa). Lopuksi mitattiin viljelysupernatanttien radioaktiivisuus nestetuikelaskimessa.

Seuraavassa kuviossa on annettu 1670-solujen viljelysupernatantin lymfotoksiiniaktiivisuus. Jokainen laimennus testattiin rinnakkain neljässä viljelymaljassa. Vain keskiarvot on annettu. Standardipoikkeama oli kolmessa ensimmäisessä laimennuksessa 3 - 4 % ja suurimmassa laimennuksessa 6 %. Tässä kokeessa käytetty viljelysupernatantti pakastettiin useaan sataan ampulliin ja sitä käytettiin referenssistandardina kaikissa lymfotoksiinikokeissa; sen aktiivisuudeksi otettiin mielivaltaisesti 100 referenssiyksikköä ml kohti (RE/ml):



- 1670-solujen viljelysupernatantti
- * Kontrollit (medium)

Vertailun vuoksi tutkittiin edellä annetussa biologisessa lyfotoksiinikokeessa viljelysupernatantit useasta ihmisten T-lymfosyytti-solulinjoista (MOLT-4, 1301, JURKAT, Karpas-45, CCRF-CEM ja CCRF-HSB-2). Missään tapauksessa ei voitu osoittaa ³H-tymidiinin vapautuneen merkittävästi enemmän verrattuna käsittelemättömiin kontrolleihin.

b) Lyfotoksiinin aktiivisuuden fysikaalis-kemiallinen

karakterisointi solulinjan 1670 viljelysupernatanteissa
suoritettiin seuraavilla kokeilla:

Stabiilisuus lämmittämistä vastaan

Stabiilisuus hapanta pH-arvoa vastaan

Stabiilisuus pakastamista ja sulattamista vastaan

Stabiilisuus natriumdodekyylisulfaattia (SDS) vastaan

Stabiilisuus pelkistäviä aineita (2-merkaptotetraoli) vastaan

Molekyyllipainon määrittäminen korkeapainenestekromatografialla
(HPLC)

Seuraavassa taulukossa on annettu stabiilisuustutkimusten
tulokset:

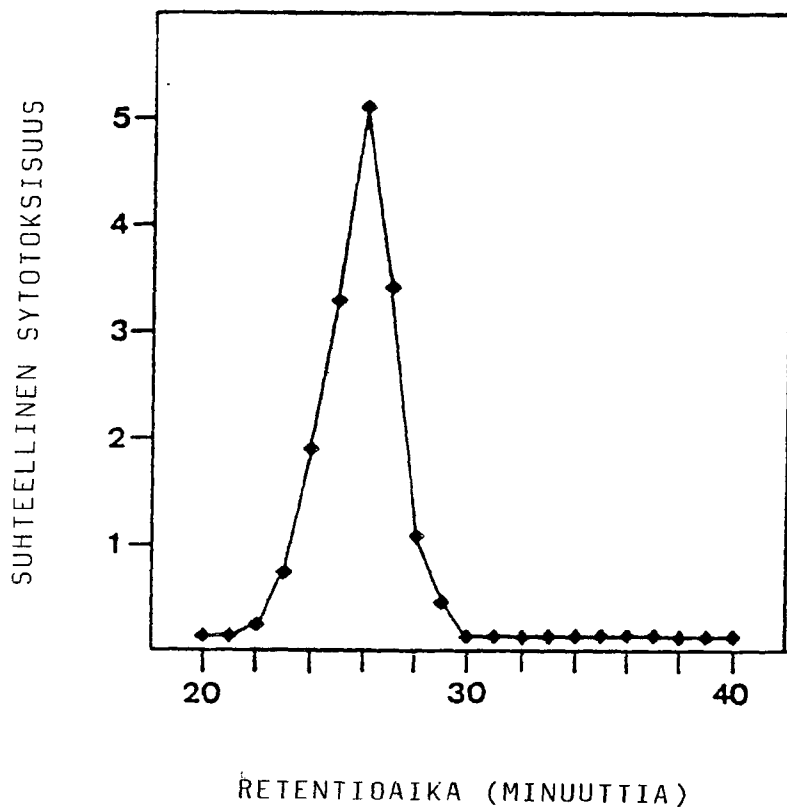
Käsittely	Lymfotoksiini-aktiivisuus, % vertailuarvosta
36°C - 5 tuntia	68 %
5 pakastamis/sulatus-jaksoa	108 %
pH 2,0 - 24 tuntia 4°C:ssa	1 %
0,1 % SDS - 1 tunti 37°C:ssa	15 %
0,1 M 2-merkaptotetraoli - - 1 tunti 37°C:ssa	95 %

Aktiivisuus on erittäin stabiili merkaptotetraolia, kuumentamisesta ja useita pakastamis/sulatus-jaksoja vastaan. Aktiivisuus tuhoutuu täydellisesti pH-arvossa 2 24 tunnin kuluessa.

Lämpöstabiilisuutta ja pH-stabiilisuutta sekä pakastamis/sulatus-jaksoja koskevat kokeet suoritettiin käsittelemättömien 1670-solujen standardi-viljelysupernatantissa, kun mukana oli 10 % vasikansikiöseerumia. Kumpatkin muut kokeet suoritettiin metsereihinillä (20 ng/ml; kts. esimerkki 4) käsiteltyjen 1670-solujen viljelysupernatantilla (proteiinipitoisuus

1 - 2 mg/ml), joka oli väkevöity ja rikastettu huokoskontrolloidulla lasilla (kts. esimerkki 4). Tämä viljelysupernatantti laimennettiin 50-kertaisesti sen jälkeen, kun oli inkuboitu natriumdodekyylisulfaatin kanssa tai merkaptetaanolin kanssa yhdessä täydellisen viljelymediumin (10 % vasikanseerumia) kanssa.

1670-soluista saadun lymfotoksiinin molekyylipaino määritettiin korkeapainenestekromatografialla (HPLC - kts. seuraava kuva):



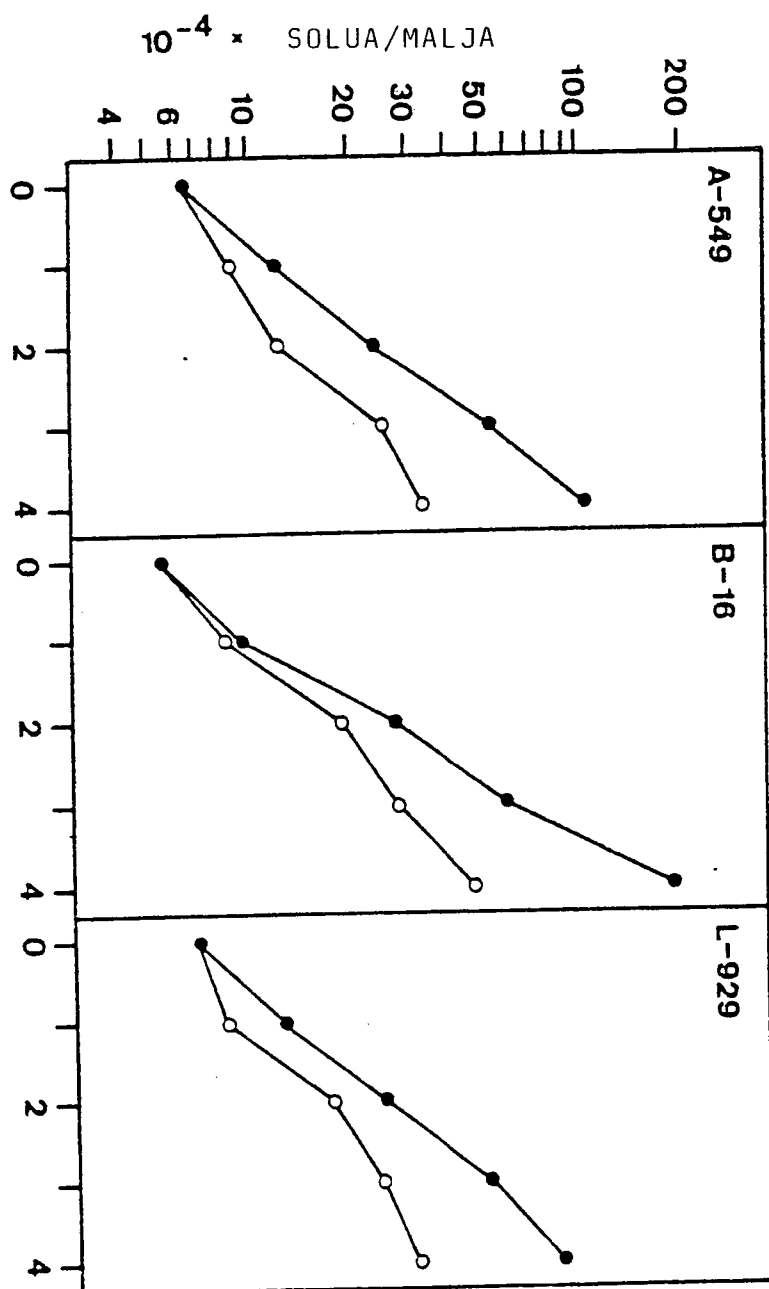
200 mikrolittraa käsittelemättömien 1670-solujen huokoskontrolloidulla lasilla väkevöityä viljelysupernatanttia erotettiin WATERS-yhtiön HPLC-laitteella (2 kolonnia I-125; 20 mM natriumfosfaatti pH 7, 1 M NaCl, 0,1 % Tween 20 (polyoksietyleni-sorbitaani-monolauraatti, n = 20, mole-

kyylipaino: noin 1200), 25 % (tilavuus/tilavuus) propyleeni-glykoli; 0,5 ml/minuutti). Otettiin 0,5 ml jakeet ja testattiin nämä. Molekyylipainon määrittämiseksi erotettiin kalibrointiproteiineina tässä samassa järjestelmässä seerumi-albumiini, ovalbumiini, trypsinogeeni ja lysotsyymi. Analyysissä näkyi vain yksi ainoa aktiivisuuspiikki, jonka molekyylipaino $60.000 \pm 15 \%$.

c) Solulinjan 1670 viljelysupernatanttien kasvua estävä vaikutus tutkittiin transformoiduilla (tuumori-) solulinjoilla. Näissä kokeissa tuumorisolut (viljelty Eagle's Minimum Essential mediumissa, jossa 10 % vasikansikiöseerumia, pensilliiniä ja streptomysiiniä) laitettiin viljelymaljoihin (50.000 solua maljaa kohti, maljan halkaisija 3 cm) ja muutaman tunnin kuluttua lisättiin mediumia tai solulinjana 1670 standardi-viljelysupernatanttia (loppukonsentraatio 16 RE/ml; 3 ml/malja). Inkuboitiin 37°C:ssa 3 tai 4 päivää, minkä jälkeen laskettiin solujen määrä maljaa kohti (kaikissa kokeissa käytettiin rinnan kahta maljaa, joissa on lymfotoksiinia tai mediumia). Kolmella solulinjalla laskettiin solujen määrä päivittäin. Tulokset on esitetty seuraavassa taulukossa ja kuvassa:

Laji	Solulinja	Inkubointiaika (päiviä)	Solunäärä/3 cm-väljelymalja (10E-5 x solua/malja) Vertailu Lymfotoksiini
Ihminen	Hela	4	8,1 0,6
	Hep-2	3	9,3 2,1
	A-549	4	10 3,4
Apina	GL-V3	3	5,6 4,5
	Vero	3	6,3 5,3
Hiiri	L929	4	8,5 3,1
	IT22	3	13 4,0
	B16	4	19 4,9
Kaniini	RK13	3	4,6 3,5

KÄSITTELYAIKA (PÄIVIÄ)



Vertailu



Lymfotoksiini

Nämä osoittavat, että 1670-solujen viljelysupernatantit voivat estää eri lajien tuumorisolujen lisääntymisen. Tämä ominaisuus on luonteenomainen lymfotoksiineille (Evans, Cancer Immunol. Immunother. 12, 181-190 (1983)); tämä erottaa tämän proteiiniryhmän erityisesti interferoneista, jotka myös voivat estää tuumorisolujen kasvun, mutta jotka kuitenkin yleensä ovat lajispesifisiä, jolloin erityisesti humaaninterferonit ovat vain vähän aktiivisia hiirisolujen suhteen tai ei lainkaan.

Edellä mainitut transformoidut ihmisten T-lymfosyytti-solulinjat sekä (tuumori-) solulinjat tunnetaan kirjallisuudesta.

Solulinja 1670 tallennettiin euroopalaisen patenttisopimuksen 28. pykälän mukaisesti 28.3.1984 numerolla I-294 kokoelmaan "Collection nationale de cultures de microorganismes (C.N.C.M.), Institut Pasteur, Paris".

Esimerkki 2

Lymfotoksiinin tuoton lisääminen apinan T-lymfosyytti-solulinjoissa diterpeni-yhdisteiden avulla

Sakeat viljelmät laimennettiin uudella mediumilla 1:2 - 1:3, seuraavana päivänä laimennettiin vielä 1:3 ja kolmeen pulloon laitettiin kulloinkin 5 ml tätä perusviljelmää. Lisättiin stimulaattorit (kantaliuokset 100 mikrogramma/ml dimetyylisulfoksidissa) ja viljelmiä inkuboitiin 3 päivää. Tämän jälkeen solut poistettiin sentrifugoimalla, supernatantit pakastettiin ja säilytettiin -20°C :ssa lymfotoksiinikokeeseen asti.

Seuraavassa taulukossa on annettu kahden valitun diterpeni-tuumoripromoottorin, so. 12-O-tetradekanoyyli-forboli-13-asetaatin (TPA) ja metsereinin vaikutus lymfotoksiinin tuottoon valituissa apinan T-lymfosyytti-solulinjoissa:

Solu- linja	Koe	Konsentraatio (ng/ml)	Lymfotoksiini-aktiivisuus supernatantissa (RE/ml)		
			Vertailu	TPA	Metseriini
1670	1	20	83	520	270
	2	20	77	210	76
	3	100	88	340	370
70N2	1	20	56	310	280
	2	20	47	120	240
	3	100	50	65	92
	4	100	12	130	160
A651	1	20	260	360	370
	2	100	130	320	270
A2543	1	20	56	140	190
	2	100	48	190	180
L77/5	1	20	3	36	86
	2	100	1	38	35
1022	1	100	480	760	930
	2	100	630	700	610

Esimerkki 3Lymfotoksiinin tuottaminen seerumittomassa mediumissa

Solujen lisääntyä seerumipitoisessa mediumissa (analogisesti esimerkin 2 kanssa) siirrettiin solut seerumittomaan mediumiin.

Seuraavassa taulukossa on verrattu lymfotoksiinin tuottoa 1670-soluissa (esimerkin 1 mukaisesti) seerumipitoisessa ja seerumittomassa mediumissa, kun mukana on 20 ng metseriiniä/ml:

Koe	Mediumin seerumipitoisuus (%)	Lymfotoksiini-aktiivisuus (RE/ml)	Proteiini-pitoisuus (mg/ml)	Spesifinen aktiivisuus (RE/mg)
1	10	370	5	74
2	10	180	5	36
3	10	270	5	54
4	0	140	0,050	2.800
5	0	72	0,053	1.400
6	0	160	0,044	3.700

Proteiini määritettiin Bradford'in menetelmällä (kts. Anal. Biochem. 72, 298 (1976)).

Esimerkki 41670-solusta saadun lymfotoksiinin väkevöinti ja puhdistaminen kromatograafisesti huokoskontrolloiduilla lasikolonneilla

1670-soluja kasvatettiin RPMI-1640 mediumissa, jossa oli 10 % vasikansikiöseerumia, pyörivissä Erlenmeyer-pulloissa (1 l-pulloissa 0,5 l viljelmää, pyörimisnopeus 40 kierr./min.). Hyvin kasvavista viljelmistä otettiin solut sentrifugoimalla, pestiin ja suspendoitiin uudelleen seerumittomaan

RPMI-1640-mediumiin, johon oli lisätty ng/ml metsereiniä. Suspensio pidettiin stationäärisenä 3 päivää 150 cm² muoviviljelypulloissa (200 ml pulloa kohti), minkä jälkeen viljelysupernatantti otettiin talteen sentrifugoimalla ja suodattamalla.

Tällä tavoin valmistetut viljelysupernatantit kromatografoitiin 10 ml huokoskontrolloidulla lasilla (huokoshalkaisija: 250 Ångström, raekoko: 120-200 mesh; kolonnin halkaisija: 9 mm, virtausnopeus: 140 ml/tunti). Sen jälkeen kolonni pestiin 10 mM natrium-fosfaattipuskurilla pH 7,2/1,5 M NaCl liuoksella ja tämän jälkeen eluoitiin samalla puskurilla 50-prosenttisessä etyleeniglykolissa (tilavuus/tilavuus).

Kahden tällaisen kokeen tulokset on annettu seuraavassa taulukossa:

	Tilavuus (ml)	<u>Lymfotoksiini</u> (RE/ml)	<u>%</u>	Proteiini (mg/ml)	Spesifinen aktiivisuus RE/mg
<u>Koe 1</u>					
Koetin	2.800	162	100	0,044	3.700
Läpijuoksu	2.800	13	8	-	-
Pesujae	10	96	1	-	-
Eluaatti	20	17.300	76	2,0	8.650
<u>Koe 2</u>					
Koetin	2.500	141	100	0,050	2.800
Eluaatti	17	8.600	41	1,6	5.400

Esimerkki 5Lymfotoksiini-mRNA-aktiivisuuden osoittaminen 1670- ja 1022-soluista saaduissa RNA-preparaateissa

Soluja suspendoitiin solutiheydellä noin 5×10^5 solua/ml 800 ml:aan soluviljelmämediumia, jossa oli 10 % vasikan-sikiöseerumia, ja lisättiin 20 ng metseriiniä/ml. 20 tunnin kuluttua solut poistettiin sentrifugoimalla, pestiin puskurissa (esimerkiksi 10 mM Tris.HCl pH 7,4, 140 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$) ja suspendoitiin 10 ml:aan Lyse-puskuria (esimerkiksi 10 mM Tris.HCl pH 8,4, 140 mM NaCl, 1,5 mM $MgCl_2$, 0,5 % Nonidet-P 40 /ioniton detergentti, SHELL-yhtiön tavaramerkki/. Suspensiota inkuboitiin jäähäuteella 10 minuuttia, minkä jälkeen sitä ravisteltiin hetki ja solutumat poistettiin sentrifugoimalla. Sentrifugoinnin supernatantista (= sytoplasma) eristettiin RNA sinänsä tunnetuilla menetelmillä, esimerkiksi uuttamalla fenolilla (kts. Aviv et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412 (1977)). Lopuksi se liuotettiin veteen (konsentraatio noin 3-5 mg/ml) ja translaatoitiin sinänsä jo tunnetuilla menetelmillä *Xenopus* laevis -oosyytteihin (kts. esim. Colman et al., Cell 17, 517-526 (1979), Hitchcock et al., Anal. Biochem. 109, 338-344 (1980) ja Contreras et al., Anal. Biochem. 113, 185-187 (1981)). Biologiassa kokeessa tutkittiin translaatiotuotteiden lymfotoksiini-aktiivisuus.

Seuraavassa taulukossa on annettu saadut sytotoksiset aktiivisuudet oosyyttisupernatanteissa verrattuna MOLT-4 soluista saatuihin RNA-preparaatteihin, ihmisen T-lymfosyyttisolulinjaan, jonka viljelysupernatantit eivät osoita havaittavaa lymfotoksiini-aktiivisuutta, sekä käsittelemättömien oosyyttien supernatantteihin:

Preparaatti	Radioaktiivisuus supernatantissa (cpm/100 mikrolitra)			
	Oosyytti-supernatanttien laimennus			
	1 : 12	1 : 42	1 : 147	1 : 514
Kontrollit (injisoimattomat oosyytit)				
	2.200	2.300	2.100	2.500
	2.400	2.200	1.800	3.000
MOLT-4 RNA Koe 1				
	1.600	2.400	1.700	2.200
Koe 2	1.700	2.300	1.600	1.800
1670-RNA Koe 1				
	4.700	4.700	3.600	2.800
Koe 2	4.300	3.800	3.300	2.600
Koe 3	3.200	2.800	2.800	
Kontrollit				
	4.400	3.300	-	-
1670-RNA Koe 1				
	6.100	5.000	-	-
1670-RNA Koe 2	6.600	5.100	-	-
1022-RNA Koe 1				
	7.000	5.000	-	-

Taulukko osoittaa, että kaikki kolme 1670-soluista saadut RNA-preparaatit sekä 1022-soluista saatu RNA-preparaatti nostaa merkittävästi vapautunutta radioaktiivisuutta aina 147-kertaiseen laimennokseen asti, kun taas MOLT-4-soluista saadulla RNA:lla ei tällaista aktiivisuutta ole. Nämä kokeet osoittavat, että 1670- ja 1022-soluista saaduissa RNA-preparaateissa on biologisesti aktiivista lymfotoksiini-mRNA.

Patenttivaatimukset

1. Lymfotoksiinin tai lymfotoksiini-mRNA:n valmistusmenetelmä, t u n n e t t u siitä, että viruksilla transformoituja apinan T-lymfosyyttejä kasvatetaan sopivassa mediumissa kestopiljelmänä ja lymfotoksiini tai lymfotoksiini-mRNA eristetään sinänsä tunnetuilla menetelmillä.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että viruksina käytetään Herpes-viruksia, parhaiten kuitenkin Herpes-virus saimiri tai Herpes-virus ateles viruksia.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että apinan T-lymfosyytteinä käytetään Saguinus-suvusta saatuja solja.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että T-lymfosyytti-solulinjoina käytetään linjoja 1022, 1670, 70N2, L77/5, A651 tai A 2543.

5. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että T-lymfosyytti-solulinjoina käytetään linjoja 1022 tai 1670.

6. Patenttivaatimusten 1 - 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että viljelymediumiin lisätään vasikansikiöseerumia 10 % asti.

7. Patenttivaatimusten 1 - 6 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että tuoton lisäämiseksi lisätään viljelymediumiin pienimolekyyllisiä tuumoripromootoreita, parhaiten diterpeenejä, erityisesti dafnan-, ingelan- ja tigliantyyppisiä, tai indoliaalkaloideja.

8. Patenttivaatimusten 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lymfotoksiinin tuoton lisää-

miseksi lisätään inkuboinnin aikana tuumoripromoottorina forbolin esterä tai metseriiniä 1-1000 ng/ml, parhaiten kuitenkin 10-100 ng/ml.

9. Patenttivaatimuksen 1 - 7 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lymfotoksiini-mRNA:n tuoton lisäämiseksi lisätään inkuboinnin aikana tuumoripromoottorina forbolin esterä tai metseriiniä 1-1000 ng/ml, parhaiten kuitenkin 10-100 ng/ml.

10. Patenttivaatimusten 1 - 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että solujen lisääntyttä seerumipitoisessa mediumissa siirretään solut seerumittomaan mediumiin.

11. Patenttivaatimusten 1 - 8 ja 10 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lymfotoksiini erotetaan viljelysupernatanteista 1 - 7 päivän, parhaiten kuitenkin 2 - 4 päivän kuluttua.

12. Patenttivaatimusten 1 - 8, 10 ja 11 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että lymfotoksiini rikastetaan huokoskontrolloidun lasikolonnin avulla.

13. Patenttivaatimusten 1 - 7 ja 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että soluja inkuboidaan viljely-mediumissa, joka sisältää vasikansikiöseerumia, ja lymfotoksiini-mRNA eristetään soluista 3 - 48, parhaiten kuitenkin 6 - 24 tunnin kuluttua.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av lymfotoxin eller lymfotoxin-mRNA, k ä n n e t e c k n a t därav, att med virus transformerade ap-T-lymfocyter odlas i lämpligt medium som per-patientkultur och lymfotoxin eller lymfotoxin-mRNA isoleras med i och för sig kända metoder.
2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att som virus användes Herpes-virus, företrädesvis dock Herpes-virus saimiri eller Herpes-virus ateles.
3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att som ap-T-lymfocyter användes från Saguinus-släkten erhållna celler.
4. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att som T-lymfocyt-cellinjer användes linjer 1022, 1670, 70N2, L77/5, A651 eller A 2543.
5. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e t e c k n a t därav, att som T-lymfocyt-cellinjer användes linjer 1022 eller 1670.
6. Förfarande enligt patentkraven 1 - 5, k ä n n e t e c k n a t därav, att till odlingsmediet tillsättes kalvfosterserum upp till 10 procent.
7. Förfarande enligt patentkraven 1 - 6, k ä n n e t e c k n a t därav, att för ökning av produktionen tillsättes i odlingsmediet lågmolekylära tumorpromotorer, företrädesvis diterpener, speciellt av Dafnan-, Ingelan- och Tigliantyp, eller indolalkaloider.
8. Förfarande enligt patentkraven 1 - 7, k ä n n e t e c k n a t därav, att för ökning av lymfotoxinproduktionen tillsättes under inkuberingen som tumorpromotor ester av forbol eller mezerin 1-1000 ng/ml, företrädesvis dock 10-100 ng/ml.

9. Förfarande enligt patentkraven 1 - 7, k ä n n e t e c k - n a t därav, att för ökning av lynfototoxin-mRNA-produktionen tillsättes under inkubationen som tumorpromotor ester av forbol eller mezerin 1-1000 ng/ml, företrädesvis dock 10-100 ng/ml.

10. Förfarande enligt patentkraven 1 - 8, k ä n n e t e c k - n a t därav, att då cellerna ökats i det serumhaltiga mediet överföres cellerna till ett serumfritt medium.

11. Förfarande enligt patentkraven 1 - 8 och 10, k ä n n e - t e c k n a t därav, att lymfototoxinet isoleras från odlings-supernatanter efter 1 - 7 dagar, företrädesvis dock efter 2 - 4 dagar.

12. Förfarande enligt patentkraven 1 - 8, 10 och 11, k ä n n e - t e c k n a t därav, att lymfototoxinet anrikas med tillhjälp av en porkontrollerad glaskolonn.

13. Förfarande enligt patentkraven 1 - 7 och 9, k ä n n e t e c k - n a t därav, att cellerna inkuberas i ett odlingsmedium, som innehåller kalvfoster serum, och lymfototoxin-mRNA isoleras från cellerna efter 3 - 48, företrädesvis dock 6 - 24 timmar.

