



FI0000930258

**(B) (11) KUULUTUSJULKAISU
UTLAGGNINGSSKRIFT****93025****C (45) Patentti myönnetty**
Patentti ilmoitettiin 10.08.1995

(51) Kv.1k.5 - Int.cl.5

C 12N 15/20, C 12P 21/00, C 07K 15/14

SUOMI-FINLAND**(FI)****Patentti- ja rekisterihallitus**
Patent- och registerstyrelsen

(21) Patenttihakemus - Patentansökning	852143
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag	29.05.85
(24) Alkuperäinen - Löpdatum	29.05.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig	01.12.85
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. - Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad	31.10.94
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet	
31.05.84 US 616502 P	31.05.84 US 616503 P
09.05.85 US 732312 P	

(71) Hakija - Sökande

1. Genentech Inc., 460 Point San Bruno Boulevard, South San Francisco, Cal. 94080, USA, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Aggarwal, Bharat Bhushan, 324 Del Rosa Way, San Mateo, Cal. 94403, USA, (US)
2. Bringman, Timothy Scott, 6571 Liggett Drive, Oakland, Cal. 94611, USA, (US)
3. Gray, Patrick William, 219 San Fernando Way, San Francisco, Cal. 94127, USA, (US)
4. Nedwin, Glenn Evan, 429 S. Hoop Pole Road, Guilford, Conn. 06437, USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

Rekombinantti lymfotoksiini
Rekombinant lymfotoksin

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

FI A 833681 (C 12N 15/00) (Cetus Corp.), EP A 100641 (C 12P 21/00) (Genentech Inc.)

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee biologisesti aktiivisten lymfotoksiinipolypeptidien synteesiä rekombinanttisoluvielmässä. Keksintö antaa käyttöön uuden nukleinihapon ja tämän sisältäviä vektoreita. Koostumukset ja menetelmät tekevät mahdolliseksi valmistaa taloudellisesti koostumuksia, jotka sisältävät yhtenäisiä lymfotoksiinipolypeptidejä sekä lymfotoksiinimuunnoksia, joiden aminohapposekvenssit eroavat luonnossa esiintyvien lymfotoksiinien aminohapposekvensseistä. Lymfotoksiinit puhdistetaan spesifiseen aktiivisuuteen $2 - 10 \times 10^7$ yksikköä/mg proteiinia, siten että puhdistuksessa käytetään uutta, liikkumattomaksi tehtyä, lymfotoksiinia neutraloivaa monoklonaalista vasta-ainetta.

Uppfinningen avser syntes av biologiskt aktiva lymfotoksinpolypeptider i rekombinant cellkulturer. Uppfinningen erbjuder en ny nukleinsyra och vektorer som innehåller denna. Kompositionerna och förfarandena möjliggör ekonomisk framställning av kompositioner, vilka innehåller enhetliga lymfotoksinpolypeptider och varianta lymfotoksiner, vilkas aminosyrasekvenser avviker från de i naturen förekommande lymfotoksinernas aminosyrasekvenser. Lymfotoksinerna renas till en specifik aktivitet av $2-10 \times 10^7$ enheter/mg protein genom rening med en ny immobiliserad lymfotoksin-neutraliserande, monoklonal antikropp.

Rekombinantti lymfotoksiini

Kyseessä oleva hakemus on jatko-osa U.S.S.N. 616 503:lle, joka jätettiin 31.5.1984. Kyseessä oleva viite kuuluu läheisesti yhteen U.S.S.N. 608 316:n kanssa, joka jätettiin 7.5.1984 ja jonka otsikkona oli "Human Lymphotoxin", sekä U.S.S.N. 616 502:n kanssa, joka jätettiin 31.5.1984 ja jonka otsikko oli "Anti-Lymphotoxin".

Kyseessä oleva hakemus koskee lymfokiinejä. Eri-
tyisesti se koskee lymfotoksiinia ja sen johdannaisia.

Lymfotoksiini identifioitiin ensin biologisena tekijänä, jolla oli solunvastaista aktiivisuutta kasvainsolulinjoja kohtaan. Lymfotoksiiniksi identifioitu ja mitogeenien stimuloimista lymfosyyteistä saatu aktiivisuus kytkeytyy sytotoksisten aktiivisuuksien sarjaan, joka ulottuu tiettyjen kasvainsolulinjojen solun kasvun ehkäisystä muiden transformoitujen solujen tunnusomaiseen solun hajaantumiseen. Kuitenkin, lymfotoksiini-aktiivisuudelle on ominaista vähäinen tai puuttuva solunvastainen aktiivisuus tutkituilla primaarisilla soluviljelmillä tai normaaleilla solulinjoilla. Tämä lymfotoksiinin oletettu, eron tekevä solunvastainen aktiivisuus johti in vivo tutkimuksiin, jotka tuovat mieleen, että lymfotoksiinilla saattaa olla tehokasta kasvaimenvastaista aktiivisuutta.

Lymfotoksiini on termi, jota on käytetty kuvaamaan molekyyliryhmää. Lymfotoksiinimolekyylit on identifioitu glykoproteiineiksi, jotka on jaettu viiteen molekyylipainoluokkaan, joista kukin on heterogeeninen varauksen suhteen. Humaani alfa- (molekyylipaino 70 - 90 000) sekä beeta- (molekyylipaino 25 - 50 000) luokat näyttävät vallitsevan useimmissa lymfosyyttisupernatanteissa. Alfa-molekyylipainoluokat voidaan varauksen perusteella erottaa ainakin seitsemään alaluokkaan, kun taas beeta-alaluokka on erotettu kahteen selvään alaluokkaan (G. Granger et al. Mozes et al.:n julkaisemassa julkaisussa, 1981, Cellular

Responses to Molecular Modulators ss. 287 - 310). On identifioitu myös lymfotoksiinin kompleksinen (molekyyli-paino >200 000) sekä γ -muoto, molekyyli-paino 10 - 20 000. Lymfotoksiinin erilaiset muodot ja luokat eroavat toisistaan stabilisuutensa ja ilmaantumisen kinetiikan suhteen viljelmässä. Alhaisen ionivahvuuden vallitessa ne saattavat edelleen aggregoitua kompleksisen luokan kanssa. Lymfotoksiinien alempien molekyyli-painoluokkien on julkaistu olevan suhteellisen epästabii-leja ja heikosti soluja hajottavia suurempiin molekyyli-painoluokkiin verrattuina (Hiserodt et al., 1976, "Cell. Immun." 26: 211; Granger et al. De Weck et al.;n julkaisemassa julkaisussa, 1980 Biochemical Characterization of Lymphokines ss. 279 - 283). γ -luokan aktiivisuutta ei ole laajalti tutkittu sen epästabiileetin vuoksi (G. Granger et al., 1978) "Cellular Immunology" 38: 388 - 402). Beeta-luokan on myös esitetty olevan epästabii-lin (Walker et al., "J. of Immun." 116 [37]: 807 - 815 [maaliskuu 1976]).

Tulisi olla ymmärrettävää, että lymfokiinien terminologia ei ole yhtenäinen. Nykyisin soluviljelmien tuotteille annetut nimet ovat suurelta osalta solujen funktio, jonka uskotaan valmistavan tuote sekä tuotteiden tulos biologisissa määrityksissä. Kuitenkin nämä tuotteet jäävät suuressa laajuudessa huonosti karakterisoiduiksi, koska monia tutkimuksia on suoritettu osittain puhdistetuilla valmisteilla ja koska tuotteiden karakterisointiin käytetyt määritykset eivät ole molekyylispesifisiä ja joka tapauksessa ne ovat huomattavan vaihtelun kohteena. Erilaisten sytotoksisten tekijöiden todellinen identtisyys jää tuntemattomaksi, koska puuttuu standarditerminologia, joka perustuu selvästi määritettäviin, erottaviin ominaisuuksiin, kuten esimerkiksi aminohapposekvensseihin tai immuuniepitopeihin. Esimerkkejä muista nimistä, joita on annettu sytotoksisille soluviljelmätuotteille, ovat kasvainkuoliotekijä (tumor necrosis factor), NK-solu-sytotoksinen tekijä (NK cell cytotoxic factor), verenvuotokuoliotekijä

(hemorrhagic necrosis factor) sekä makrofaagi-solumyrkky (macrophage cytotoxin) tai sytotoksinen tekijä.

Käsiteltävänä oleva ja U.S.S.N. 608 316:ksi merkitty hakemus, joka on jätetty 7.5.1984, sekä EP 100 641A (julkaistu 15.2.1984) kuvaavat humaanin lymfoblastisolu-

5 linjasta RPMI-1788 eristetyn humaanilymfotoksiinin aminohapposekvenssejä.

Hayashi et al., EP 132 125A (julkaistu 23.1.1985) kuvaavat proteiinin takaisinsaintia kaniinilta sekä sen

10 jälkeen tapahtuvaa kaniinin retikuloendoteliaali-järjestelmän stimulaatiota. Proteiinilla tiedotettiin olevan kasvaimen vastaista aktiivisuutta, ja sen aminohapposekvenssi oli Ser-Ala-Ser-Arg-Ala-Leu-Ser-Asp-Lys-Pro-Leu-Ala-His-Val-Val-Ala-Asn-Pro-Gln-Val-Glu-Gly-Gln-Seu-Gln-

15 Trp-Leu.

Käsiteltävänä oleva ja yleisesti U.S.S.N. 628 059:ksi merkitty hakemus, joka on jätetty 5.7.1984, julkaisee sytotoksisen humaanipolypeptidin puhdistuksen ja rekombinantti-synteesin, polypeptidi on identifioitu kasvain-

20 kuoliotekijäksi ja sen N-terminaalinen aminohapposekvenssi on Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-His-Val-Val-Ala-Asn-Pro.

Ohnisni et al. (US-patentti 4 481 137) julkaisevat saaneensa BALL-1-soluviljelmästä aineen, jonka molekyypaino on 7 - 9 000 ja joka on nimeltään CB_{x3} ja supressoi kasvainsolujen kasvua ja jolla N-pääte on Ala-Ala.

25

Tothin ja Grangerin mukaisesti, "Mol. Immun." 16: 671 - 679 (1979), sialihapon poistamisella lymfotoksiinia sisältävistä lymfosyyttisupernatanteista eikä N-asetyyli-glukosamiinin, galaktoosin, laktoosin, mannoosin,

30 α-metyyli-mannosidin tai fukoosin lisäyksellä supernatantteihin ollut mitään vaikutusta soluja hajoittavaan aktiivisuuteen in vitro. Toth et al. päättelivät täten, ettei yksinkertaisilla sokereilla ollut mitään osuutta

35 kyseessä olevan lymfotoksiinin aktiivisuuteen. Kuitenkin Toth et al. havaitsivat myös, että sakkarideilla on tärkeä

osuus muiden lymfokiinien toiminnassa, ja he päättelivät, että he eivät voi sulkea pois oligosakkaridien monimutkaisempien muotojen osallistumista lymfotoksiinin sytotokseen aktiivisuuteen.

5 Myöhemmin Proctor, Klostergaard ja Granger ("Clinical Research", 1982, 30(1): 55A) tiedottivat, että ihmisen lymfosyytit, kun niitä aktivoitiin PHA:lla tunikamysiinin läsnäollessa (inhiboimaan N-kytkettyjen hiilihydraattiosasten lisäys lymfotoksiini-molekyyleihin), vapauttivat biologisesti inerttiä lymfotoksiinia. Näiden kirjoittajien mukaan, immunokemialliset tutkimukset ilmaisivat, että vaikka lymfotoksiinin hiilihydraattiosaa ei tarvittu lymfotoksiinin kuljetukseen eikä sen vapautumiseen aktivoituneen lymfosyytin avulla supernatanttiin, hiilihydraattia tarvittiin tehokkaaseen kohdesolun hajoittamiseen, koska hiilihydraattiosa vastasi lymfotoksiini-molekyyli(e)n sopivasta konformaatiosta.

 Muuhun kirjallisuuteen, jota tulisi tutkia tässä yhteydessä, kuuluvat julkaisut, Evans, "Cancer Immunol. Immunother." 12: 181 - 190 (1982); Lee et al., "Cell. Immun." 48: 166 - 181 (1979); De Weck et al. julkaisijat, (1980) Biochemical Characterization of Lymphokines ss. 279 - 312; Khan et al. julkaisija (30.6.1982) Human Lymphokines ss. 459 - 477; Aggarwal et al., Presentation at the 3rd International Lymphokine Workshop in Haverford, PA., elokuu 1 - 5 1982; Ranson et al., "Cancer Research" 43: 5222 - 5227 (marraskuu 1983); Kull et al., "J. of Immun." 126(4): 1279 - 1283 (huhtikuu 1981); J. Sawada, et al., "Jpn. J. Exp. Med." 46: 263 - 267 (1976); G. Granger et al., "Cell. Immunol." 38: 388 - 402 (1978); J. Rundell et al., "Immunopharmacology" 3: 9 - 18 (1981); G. Granger et al., "J. Lymphokine Res." 1: 45 - 49 (1982); N. Ruddie et al., "Lymphokine Res." 2: 23 - 31 (1983); M. Mitsunashi et al., U.K. Patent Application 2 106 117; H. Enomoto, European Patent Application 87 087A; B.

Williamson et al., "P.N.A.S. USA" 80:5397 - 5401 (1983)
sekä S.Wright et al., "J. Immunol." 126: 1516 - 1521
(1981).

5 Lymfotoksiini (tai aineet, jotka on identifioitu
lymfotoksiiniksi), joka on saatu tähän mennessä lymfosyyt-
tiviljelmästä, on läsnä alhaisina konsentraatioina, suu-
ruusluokaltaan $0,05 - 2 \times 10^6$ yksikköä/l, RPMI-1788-solujen
tai primaaristen lymfosyyttien supernatanteissa. Kootut
10 määrät vaihtelevat usein huomattavasti, ja primaariset
lymfosyytit ovat kalliita. Tarvitaan taloudellista mene-
telmää lymfotoksiinin valmistamiseksi (Yamamoto et al.,
"J. of Biological Response Modifiers" 3: 17 76 - 87
1984).

Aiempien menetelmien mukaisesti myös epäonnistui
15 valmistaa lymfotoksiinia, joka on homogeeninen aminohappo-
sekvenssin suhteen, mikä on tärkeä piirre lääkkeen käyttö-
kelpoisuudelle. Solulinjaviljelmistä takaisin saadulla
lymfotoksiinilla on heterogeenisuutta aminopäättteen suh-
teen, mikä luultavasti johtuu proteolyyttisestä toimin-
20 nasta (katso yllä mainittu U.S.S.N. 608 316). Primaaris-
ten lymfosyyttien, jotka on saatu esim. liikaa kasvaneesta
nielun kattorisasta tai perifeerisestä verestä, viljelmien
täytyy välttämättä, taloudellisista syistä, sisältää
monien luovuttajien soluja. Kuitenkin näiden solujen
: 25 tuotteet tulevat heijastamaan luovuttajien piirissä val-
litsevaa geneettistä vaihtelua, niin että syntyvä lymfo-
toksiini saattaa tosiasiassa olla alleelisten lajien seos.
Ilmeisesti sellaisten alleelien osuudet ja identtisyydet
tulevat olemaan tuntemattomia erästä erään. Tarvitaan
: 30 menetelmää aminohapposekvenssinsä suhteen yhtenäisen lym-
fotoksiinin valmistamiseksi.

Aiemmat menetelmät rajoittuvat myös lymfotoksiinin
valmistamiseen, jolloin tuotteen primaariset aminohappo-
sekvenssit vastaavat luonnossa esiintyvän lymfotoksiinin
35 aminohapposekvenssejä. Erilaisten aminohappojen substituu-

tio, deleetio tai insertio näissä sekvensseissä edellyttäisi laajoja ja kalliita kemiallisia modifikaatioita, jos sellaisia voisi suorittaa ollenkaan. Tarvitaan menetelmiä muunnosten aikaansaamiseksi lymfotoksiinin aminohapposekvensseihin.

5 Vaikka kirjallisuudessa on vuodesta 1968 lähtien esitetty tietoja lymfotoksiiniaktiivisuuden kasvaimenvastaisista vaikutuksista ja ilmeisestä terapeuttisesta arvosta, lymfotoksiinia ei ole tutkittu laajoissa kliinisisissä kokeissa eikä siitä ole tehty kaupallista tuotetta, mikä johtuu aiempien menetelmien avulla saatavissa olevan lymfotoksiinin heterogeenisestä luonteesta. Tarvitaan menetelmiä klinisiin tutkimuksiin riittävien lymfotoksiinimäärien taloudelliseksi valmistamiseksi.

15 Kirjallisuudessa on kuvattu kaniinin antiseerumia, joka pystyy neutraloimaan erilaisten sytotoksiinien sytolyyttistä aktiivisuutta, lymfotoksiiniksi identifioidut aineet mukaan luettuina (Yamamoto et al., "Cell. Immun." 38: 403 - 416 (1978); Gately et al., "Cell. Immun." 27: 20 82 - 93 (1976); Hiserodt et al., "J. of Immun." 119(2): 374 - 380 (1977); Zacharchuk et al., "P.N.A.S. USA" 80: 6341 - 6345 (lokakuu 1983); Ruddle et al., "Lymphokine Research" 2(1) 23 - 31 (1983); Mannel et al., "Infection and Immunity" 33(1): 156 - 164 (1981); Wallac et al. : 25 E. De Maeyer et al. julkaisijat The Biology of the Interferon System ss. 293 - 302 (julkaistu syyskuussa 1983) ja Stone-Wolff et al., "J. Exp. Med" 159: 828 - 843 (maaliskuu 1984). Koska tämä antiseerumi on polyklonaalinen, se sisältää lymfotoksiini-immunogeenia vastaan kohdistuvien vasta-aineiden moninaisuuden. Jokin tai useampi : 30 näistä vasta-aineista toimii "lymfotoksiini"-aktiivisuuden neutraloimiseksi. Edelleen, kirjallisuuden tiedot yleensä ovat epäselviä, mitä tulee immunogeeninä käytetystä lymfotoksiiniaktiivisuudesta vastaavan aineen molekulaariseen identtisyyteen. Diagnoosiin ja immunoaffiniteetti-puhdis- 35

tusmenetelmiin tarvitaan monospesifistä vasta-ainetta, joka on suuntautunut selvästi ja yksiselitteisesti identifioitua lymfotoksiinimolekyyliä kohtaan. Kyseessä olevan keksinnön kohteena on tarjota käyttöön sellainen vasta-

5

aine. Lisäkohteena on edelleen antaa käyttöön taloudellisia syntetisoimismenetelmiä lymfotoksiinimuodolle, jonka rakenne on sellainen, että oleellisesti kaikkien lymfotoksiini-molekyylien primaarinen aminohapposekvenssi on sama.

10

Keksinnön eräänä toisena kohteena on saada aikaan ennalta määrättyjä muunnoksia lymfotoksiinimuodon aminohapposekvenssissä, tarkemmin sanottuna aminohappodeleetioita, insertioita, substituutioita tai niiden yhdistelmiä.

15

Keksinnön kohteena on ollut toteuttaa proteiinin, jolla on lymfotoksiinin aktiivisuutta, onnistunut rekombinanttiekspressio. Lymfotoksiini-lajia, jota kuvataan tässä yhteydessä aktiivisuutensa sekä luonnollisen että vaihtoehtoisen aminohapposekvenssin termein, nimitetään vastedes lymfotoksiiniksi. Yllättäen on havaittu, ettei lymfotoksiinia koodittava DNA kestä vähäisiä määriä homologisissa soluissa ekspressoitunutta lymfotoksiinia, ja on todettu epävarmuus ajan suhteen, jolloin lymfotoksiinia koodittava lähetti-RNA tulee näkyviin homologisissa soluissa. On myös yllättävää, että biologisesti aktiivinen lymfotoksiini ekspressoituu rekombinantti-soluissa, jotka eivät glykosyloi lymfotoksiinia (tai joiden ei oleteta tekevän niin samalla tavalla kuin homologiset solut), ja näin ekspressoidulla lymfotoksiinilla, joka saadaan takaisin, on oleellisesti yhtenäinen aminohapposekvenssi, ilman N-päätteessä tapahtunutta entsymaattista hydrolyysiä. Lymfotoksiinia koodittava DNA ilmentyy soluviljelmissä kopiomäärinä, jotka ylittävät $0,1 - 1 \times 10^{11}$ yksikköä/litra viljelmää, josta solut on hajoitettu.

20

25

30

35

Lymfotoksiini, jonka rekombinantti-isäntäsolu ilmentää, riippuu lymfotoksiinin koodaamiseen käytetystä DNA:sta tai sen prekursoreista sekä valitusta isäntäsolusta. Tässä yhteydessä lymfotoksiinin synteesiin käytetyt nukleiinihapposekvenssit ovat uusia. Niille ovat ominaisia nukleotidisekvenssit, jotka eroavat alkuperäisestä tai luonnossa esiintyvistä sekvenssistä yhdellä tai useammalla, seuraavana mainituista tavoista: DNA:ssa ei ole introneita; humaanilymfotoksiinin ollessa kysymyksessä, läsnäoleva introni sijaitsee nukleotidien 284 ja 285 välissä (kuvio 2a); DNA ei sisällä vapaata nukleiinihappoa, joka koodittaa organismin, josta DNA on peräisin, muita proteiineja; lymfotoksiinia koodittava nukleiinihappo on kytketty vektoriin; ja/tai nukleiinihappo voi hybridisoida lymfotoksiinia koodittavan nukleiinihapon edellyttäen, että sellaisella hybridisoivalla nukleiinihapolla ei ole luonnossa esiintyvän, lymfotoksiinia koodittavan DNA:n tai RNA:n nukleotidisekvenssiä.

Nukleiinihappojen mutantit, jotka koodittavat lymfotoksiinia, ovat rekombinanttimanipulaatioiden tuote. Toimimattomat mutaatiot lymfotoksiinia vastaavassa 5'-nukleiinihapossa, joka on luettu tai jota ei ole luettu, annetaan käyttöön lisäämään ilmentymisen tasoja valituissa isännissä, esim. vähentämällä varsi- ja-kierukka-RNA-rakenteiden todennäköisyyttä nukleiinihapon 5'-alueilla, tai korvaamalla luonnossa esiintyvistä nukleiinihappoeristyksistä löydettyt kodonit isännän suhteen edullisilla kodoneilla.

Nukleiinihapoissa esiintyvät mutaatiot, jotka ilmentyvät pikemminkin kuin ne, jotka eivät toimi, tekevät mahdolliseksi valmistaa lymfotoksiini-lajeja, joilla on alkuperäisen lymfotoksiinin aminohapposekvenssi tai sen variantin primaarinen sekvenssi aminohapposekvenssein, jotka eroavat alkuperäisestä lymfotoksiinista. Lymfotoksiinimutantti saadaan takaisin sellaisenaan tai isäntäsolun käsittelemänä halutun lymfotoksiinilajin saamiseksi.

Nämä nukleiinihapot tai nukleiinihapot, jotka hybridisoituvat niiden jälkeen, tai niiden fragmentit merkataan ja käytetään hybridisaatio-määrittelyssä lymfotoksiinia koodittavan geneettisen materiaalin identifiointiin tai määrittämiseen.

Lymfotoksiinin synteessimenetelmissä DNA, joka koodittaa lymfotoksiinia, kytketään vektoriin, vektori käytetään isäntäsolujen transformointiin, isäntäsoluja viljellään ja lymfotoksiini otetaan takaisin viljelmästä. Tätä yleistä menetelmää käytetään syntetisoitaessa lymfotoksiinia, jolla on alkuperäisen lymfotoksiinin aminohapposekvenssi, tai konstruoitaessa uusia lymfotoksiinin muunnoksia, riippuen vektorin konstruktiosta sekä transformatioon valitusta isäntäsolusta. Lymfotoksiinilajeihin, jotka voidaan syntetisoida kyseessä olevassa tapauksessa, sisältyy lymfotoksiini, jossa leusyyli on amino-päättteenä, lymfotoksiini, jossa histidyyli on amino-päättteenä, prelymfotoksiini sekä lymfotoksiinin muunnoksia mukaanluettuina (a) fuusioproteiinit, joissa heterologinen proteiini tai polypeptidi on yhdistetty peptidisidoksella lymfotoksiinin amino- ja/tai karboksyylipään aminohappoihin, (b) lymfotoksiinifragmentit, erityisesti prelymfotoksiinin fragmentit, joissa mikä tahansa aminohappo välillä -34 ja +23 on fragmentin aminopäättteen aminohappo, (c) lymfotoksiinimutantit, joissa yksi tai useampia aminohappotähteistä on substituoitu, insertoitu tai niissä on tapahtunut deleetio, (d) johdannaiset, joissa metionyyli tai muunnettu metionyyli (kuten esimerkiksi formyylimetioniini tai muut suljetut metionyyli-lajit) on amino-päättteenä, ja/tai (e) kaikkien edellä mainittujen glykosyloimattomat tai vaihtelevasti glykosyloidut lajit.

Jos nisäkässolu transformoidaan lymfotoksiinin koodittavalla nukleiinihapolla, joka on toiminnallisesti kytketty eukaryoottiseen erityisjohdantopakettiin (alkuperäinen, lymfotoksiinin erittymisestä vastaava johdantopaketti mukaan-

luettuna) tai jos lymfotoksiinia koodittava nukleiinihappo on toiminnallisesti kytketty vektorissa prokaryottiseen tai hiivan erityisjohdantopaksoon, jonka transformoitava isäntäsolu tunnistaa (tavallisesti organismi, josta johdantopakso on otettu), isäntä transformoidaan vektorilla ja viljellään, sitten lymfotoksiinilajit, jotka eivät tavallisesti sisällä aminopäässä metioniinia, saadaan viljelmästä takaisin.

Jos lymfotoksiinia koodittava DNA on toiminnallisesti kytketty vektoriin ilman erityisjohdantosekvenssiä ja sitten käytetty isäntäsolun transformointiin, syntetisoidut lymfotoksiini-lajit ovat yleensä substituoidut aminopäänteisellä metionyyllillä tai muunnetulla metionyyli-tähteellä, kuten esimerkiksi formyylimetioniinilla.

Esillä oleva keksintö koskee menetelmää lymfotoksiinien valmistamiseksi yhdistelmä-DNA-tekniikalla sekä tarkoitukseen käyttökelpoisia nukleiinihappoja ja vektoreita. Kuvataan, kuinka lymfotoksiinia koodittavan nukleiinihapon mutaatio in vitro johtaa lymfotoksiinivarianttien ilmentymiseen, jotka eivät ole tähän mennessä olleet saatavilla. Ensinnäkin, N-terminaalisesti metionyyliä tai muunnettua metionyyliä sisältävä lymfotoksiini ekspressoituu isäntäsoluissa, jotka on transformoitu nukleiinihapolla, joka koodittaa lymfotoksiinia, joka ilmentyy suoraan, se on, joka on toiminnallisesti kytketty erityisjohdantosekvenssiin.

Toiseksi, in vitro on käytetty sijainnin suhteen spesifisiä, ennalta määrättyjä tai satunnaisia mutaatioita saamaan aikaan deletioita, substituutioita ja/tai insertioita nukleiinihappoon, joka koodittaa lymfotoksiinia. Lymfotoksiinifuusiot saadaan aikaan tällä tavalla. Nukleiinihapon mutaation ekspression avulla saaduilla lymfotoksiinijohdannaisilla on muunnettuja ominaisuuksia.

Lopuksi, glykosyloimattomia tai vaihtelevasti glykosyloituja lymfotoksiineja annetaan käyttöön uusina lymfotoksiini-lajeina. Glykosyloimaton lymfotoksiini valmistetaan lymfotoksiinia koodittavan, prokaryoottisen eks-

pression avulla. Vaihtelevasti glykosyloidut lymfotoksiinilajit ovat rekombinantti-viljelmän tuote transformoiduissa korkeammassa eukaryootti-, tavallisesti nisäkässoluissa.

Kyseessä olevan keksinnön mukaisesti valmistettu
5 lymfotoksiini puhdistetaan viljelmäsupernatanteista tai hajotetuista soluista immunoaffiniteettiadsorption avulla käyttämällä liukenematonta lymfotoksiinia neutraloitavaa vasta-ainetta. Tämä vasta-aine, joka tehokkaimmin valmistetaan monoklonaalisessa soluviljelmässä, saadaan aikaan
10 hiiressä immunisoimalla se aluminiumsulfaattiin adsorboidulla lymfotoksiinilla.

Kyseessä olevan keksinnön mukainen lymfotoksiini yhdistetään terapeutista käyttöä varten fysiologisesti vaarattomaan stabiloimisaineeseen sekä täyteaineen kanssa,
15 ja se valmistetaan steriiliin annosmuotoon, esimerkiksi lyofilisoimalla annospulloissa tai varastoimalla se stabiloituina vesivalmisteina. Vaihtoehtoisesti, lymfotoksiini sisällytetään polymeerimatriisiin kiinnitettäväksi kasvaimen tai leikkauskohtaan, josta kasvaimet on poistettu,
20 jolla tavalla saadaan aikaan lymfotoksiinin hidas vapautuminen paikallisena, korkeana konentraatiogradienttina.

Koostumukset annostellaan terapeutisesti tehokkaina annoksina implantaation, injektion tai infuusion avulla eläimille, erityisesti ihmispotilaille, joilla on pahan-
25 laatuksia kasvaimia.

Kuvio 1a kuvaa DNA-sekvenssiä sekä sen lymfotoksiini-fragmenttia koodittavaa aminohapposekvenssiä.

Kuvio 1b havainnollistaa kuviossa 1a esitettyä fragmenttia koodittavan synteettisen DNA:n rakennetta.

30 Kuvio 2a esittää pre-lymfotoksiinin täydellistä aminohapposekvenssiä, sitä koodittavaa DNA:a sekä 5' - ja 3' - reunustavia, ei transloituja alueita.

Kuvio 2b valaisee menetelmää ekspressiovektorin konstruoinniseksi metionyyli-leusyyli-amino-päänteiselle
35 lymfotoksiinille sekä sen amino-päänteisiä metionyyli-johdannaisia.

Kuvio 3 esittää menetelmää ekspressio-vektorin konstruomiseksi metionyyli-histidyyli-aminopäätteiselle lymfotoksiinille.

5 Kuvio 4 esittää ihmisen, hiiren ja härän lymfotoksiinin aminohapposekvenssiä sekä yhteisiä nisäkkään lymfotoksiinin tähteitä.

Kuviot 5a sekä 5b esittävät plasmidin rakennetta, joka koodittaa lymfotoksiinin ja bakteerin signaalisekvenssin yhteenliittymää.

10 Lymfotoksiini määritellään kyseessä olevan hakemuksen tarkoituksiin biologisesti aktiivisena polypeptidinä, jossa on alue, joka havainnollistaa oleellisen, rakenteellisen aminohappohomologian ainakin osan kanssa kuviossa 2a esitettyä lymfotoksiinin aminohapposekvenssiä.
15 Biologinen aktiivisuus määritellään valikoivana, sytotoksisena aktiivisuutena alla määritellyllä tavalla, immunologisena risti-reaktiivisuutena sytotoksisen lymfotoksiinin kanssa tai kykynä kilpailla sytotoksisen lymfotoksiinin kanssa lymfotoksiinin solunpintareseptoreista. Kah-
20 dessa viimeksi mainitussa esimerkissä lymfotoksiinin ei sinänsä tarvitse olla sytotoksinen. Immunologisesti risti-reaktiiviset mutantit ovat immunogeeneina käyttökel-
poisia anti-lymfotoksiinin muodostamiseksi eläimissä, esim. immunologisten määritysmenetelmien reagenssien val-
25 mistamiseksi, kun taas ei-sytotoksisilla, kompetitiivisilla mutanteilla on käyttöä merkattuina reagensseina tyy-
piltään kompetitiivisissä immunologisissa määrityksissä, biologisesti aktiivista lymfotoksiinia määritettäessä.

Valikoiva sytotoksinen aktiivisuus määritellään
30 kasvainsolujen valikoivana hajoamisena tai kasvun inhibitiona in vivo tai in vitro, samoissa olosuhteissa normaaleihin soluihin verrattuna. Kasvainsolujen tuhoaminen hajoittamalla solut in vitro tai kuolion avulla in vivo on määrityksen edullinen päätepiste, vaikka solun kasvua
35 ja lisääntymisaktiivisuutta on käytetty myös tyydyttävästi.

Sopivia määrittämenetelmiä solunvastaisten lymfotoksiinin aktiivisuuksien havaitsemiseksi kuvataan julkaisussa B. Aggarwal, et al., 1984, "J. Biol. Chem." 259 (1), 686 - 691 sekä E. Carswell, et al., 1975, "Proc. Natl. Acad. Sci. USA" 72, 3666 - 3670.

5 Lymfotoksiinin spesifinen aktiivisuus määritellään kyseessä olevan hakemuksen yhteydessä kohdesolun hajoamisena pikemmin kuin solun kasvun ehkäisynä. Lymfotoksiinin yksikkö määritellään sellaisena lymfotoksiinin määränä,
10 joka tarvitaan kuhunkin kammioon esimerkissä 1 kuvatulla tavalla esisiirrosettujen kohdesolujen 50-%:iseen hajoamiseen. Kuitenkin hyväksytään sytotoksisen aktiivisuuden muut määrittämenetelmät.

Oleellisella, rakenteellisella homologialla tarkoitetaan yleisesti sanoen, että enemmän kuin 60 %, ja tavallisesti noin 70 % polypeptidin aminohappotähteistä on samoja tai kuviossa 2a esitetyssä sekvenssissä sijaitsevien, vastaavien tähteiden (vastaavan tähteen) säilyttäviä substituutioita.

20 Lymfotoksiinin polypeptidi-sekvenssin ei tarvitse olla kokonaan homologinen kuviossa 2a esitetyn sekvenssin kanssa. Ainoastaan osan siitä tulee olla homologinen jonkin osan kanssa kuviossa 2a esitettyä sekvenssiä edellyttäen, että ehdokkaalla on tarvittava biologinen aktiivisuus. Yleisesti sanoen, homologia tulisi havainnollistaa
25 noin 20 - 100 aminohappotähteelle, ymmärtäen kuitenkin, että satunnaisia aukkoja saatetaan kuitenkin käyttää homologian maksimoimiseksi.

Vähemmän homologiaa edellytetään määritelmän piiriin
30 kuuluvilta polypeptideiltä, jos kuvion 2a esittämän sekvenssin kanssa homologinen alue ei ole jokin lymfotoksiinin avainalueista, esim. sytotoksiselle aktiivisuudelle tärkeistä alueista. Kuvion 2a esittämän sekvenssin avainalueiden uskotaan olevan suunnilleen tähteet 162 - 171,
35 52 - 83 sekä 127 - 148.

Lymfotoksiinin määritellään spesifisesti sulkevan pois ihmisen kasvainkuoliotekijän (human necrosis factor) tai sen luonnossa esiintyvät eläinanalokit (D. Pennica et al., "nature" 312: 20/27 joulukuu, 1984, ss. 724 - 729 sekä B. Aggarwal et al., "J. Biol. Chem." 260 /47: 2345 - 2354 /1985/).

Rakenteellisesti samankaltainen tarkoittaa aminohap-
posivuketjujen vallitsevia ominaisuuksia, kuten esimerk-
kiksi emäksisyyttä, neutraaliutta tai happamuutta, hydro-
fiilisyyttä tai hydrofobisuutta tai steerisen esteen poissa-
oloa. Rakenteellisesti samankaltaisen aminohapon korvaami-
nen toisella aminohapolla tunnetaan yleensä säilyttävänä
substituutina.

Merkittävä tekijä näytettäessä toteen polypeptidin,
kuten lymfotoksiinin identtisyyttä, on antiseerumin,
joka pystyy oleellisesti neutraloimaan homogeenisen, lym-
foblasti (eli luonnosta peräisin olevan) -lymfotoksiinin,
kyky myös oleellisesti neutraloida kyseessä olevan poly-
peptidin sytolyttinen aktiivisuus. Kuitenkin on ymmär-
rettävä, että immunologinen identtisyys ja sytotoksinen
identtisyys eivät välttämättä esiinny yhdessä. Kuvion 2a
mukaisen lymfotoksiinin vasta-aine ei voi sitoa proteiini-
ehdokasta, koska neutraloiva vasta-aine sattuu olemaan
suunnattu lymfotoksiinia kohtaan joka on vain naapurina
alueelle, joka on kriittinen lymfotoksiinin aktiivisuudelle,
mutta joka toimii neutraloivana vasta-aineena estäen stee-
risesti lymfotoksiinin aktiivisen kohdan. Proteiiniehdo-
kas, joka on mutatoitunut tällä yhdentekevällä alueella,
ei voi enää sitoa neutraloivaa vasta-ainetta, mutta se
olisi kuitenkin lymfotoksiini oleellisen homologian ja
biologisen aktiivisuuden muodossa esitettyä.

Lymfotoksiinilla, joka on saatu lymfoblastisolu-
linjojen viljelmillä, on määritetty olevan seuraavat
ominaisuudet: molekyyllipaino 20 000 tai 25 000, riippuen
glykosylaation asteesta N-päättteen heterogeenisuudesta;

glykosylointi Asn+62:ssa (kuvio 2a); aggregoitumistai-
pumus, erityisesti taipumus järjestäytyä multimeereiksi;
isoelektrinen piste noin 5,8; pH:n suhteen epästabiili
(sytolyyttisen aktiivisuuden häviäminen suurempi kuin
5 >50 %, kun säilytys on tapahtunut 24 tunnin ajan ammonium-
bikarbonaatti-puskurissa, 10 $\mu\text{g/ml}$:n konsentraationa,
pH-tason ollessa 5:n alapuolella tai suurempi kuin noin
10); oleelliset aktiivisuuden häviöt inkuboitaessa vesi-
liuoksessa 5 minuutin ajan, 80°C:ssa. On identifioitu
10 kaksi lymfoblasti-lymfotoksiini-molekyyllilajia. 25 000
daltonin lymfoblasti-lymfotoksiini-lajilla on aminopäät-
teinen leusiini-tähde. Polypeptidejä, joiden primaarinen
aminohapposekvenssi on 25 000 daltonia, ovat nimeltään
leusyyli-amino-päätteisiä lymfotoksiineja. Lymfoblasti-
15 lymfotoksiineille, jotka ovat 20 000 daltonin (da) tyyppiä,
on ominaista aminopäätteinen histidiini, ja vastaavia
sekvenssejä nimitetään histidyyli-amino-päätteiseksi
lymfotoksiiniksi. On tärkeää havaita, että nämä ominai-
suudet kuvaavat alkuperäistä sekä villiä humaanilymfo-
20 toksiini-tyyppiä, jotka on saatu lymfoblasti-soluviljel-
mistä. Samalla kun tässä yhteydessä määritellyn lymfo-
toksiinin piiriin kuuluu alkuperäinen, glykosyloitu lymfo-
toksiini, muut läheiset sytotoksiset polypeptidit kuulu-
vat määritelmän piiriin. Esimerkiksi, glykosylaatiota,
25 joka tavallisesti liittyy eläinlymfotoksiiniin, saate-
taan modifioida ilmentymisen avulla heterologisessa,
eukaryoottisessa rekombinantti-isäntäsolussa, jolloin
saadaan aikaan muunnettu lymfotoksiini, joka kooltaan ei
kuulu molekyylipainojen piiriin tai jonka isoelektrinen
30 piste on sama kuin ihmisen lymfoblastilymfotoksiinilla.
Lymfotoksiinia, joka on kokonaan glykosyloimatonta, val-
mistetaan rekombinantti-bakteeriviljelmässä, ja molekyylipainoltaan, isoelektriseltä pisteeltään ja muilta ominai-
suuksiltaan se vastaa muunnettua lymfotoksiinia. Lisäksi
35 pre-lymfotoksiinin translaation jälkeisessä valmistuksessa
ensimmäisistä eläinlajeista, solulinjassa, joka on peräi-

sin toisilta eläinlajeilta, saattaa olla tuloksena erilainen amino-päätteinen tähde kuin tavallisesti on laita. Samalla tavalla, tässä yhteydessä käyttöön annettu mutatio esimerkiksi tekee mahdolliseksi muuttaa lymfotoksiinin aminohapposekvenssiä ja N-päätettä, jolloin pH-stabiilisuus, isoelektrinen piste yms. sellainen muuttuvat.

Kuviossa 2a esitetään humaanilymfotoksiinille aminohapposekvenssiä, jolle translaatio on suoritettu. Huomaa, että tähän sekvenssiin sisältyy 34 tähdettä esisekvenssiä, jonka uskotaan poistuvan humaanisoluissa, muokattaessa normaalisti transkriptiotuotetta, jolle translaatio on suoritettu (tässä yhteydessä, yhdessä sen mutanttien, "pre-lymfotoksiinin" kanssa), jolloin tuloksena on leusyyli-aminopäätteinen laji. Histidyylin amino-päätteenä sisältävä laji on homologinen leusyylin amino-päätteenä käsittävälle lajille, paitsi että leusyyli-amino-terminaalisen lajin 23 ensimmäistä aminohappoa puuttuvat. Kaikki kolme lajia, esim. pre-lymfotoksiini, leusyyli-amino-terminaalinen lymfotoksiini sekä histidyyli-amino-päätteisen lymfotoksiini, samoin kuin niiden metionyyli-, modifioitu metionyyli-, mutantti- ja glykosyloimattomat muodot sisältyvät lymfotoksiinin piiriin. Glykosyloimattomalla leusyyli- ja histidyyli-amino-päätteisillä lajeilla on alhaisemmat molekyylipainot kuin edellä on kuvattu lymfoblastisoluista saatujen homologisten lajien suhteen.

Pre-lymfotoksiini on lymfotoksiini-laji, joka sisältyy edellä esitetyn määritelmän piiriin. Sille on ominaista signaali- (tai johdanto-) polypeptidi molekyylin amino-päätteessä. Yleisesti sanottuna, lymfotoksiinin alkuperäinen signaali-polypeptidi pilkkoutuu proteolyytisesti lymfotoksiinista eritystapahtuman osana, jossa proteiini erittyy solusta. Signaali-peptidi saattaa olla mikrobi- tai nisäkäsperäinen (alkuperäinen, 34-tähde-esisekvenssi mukaanluettuna), mutta se on mieluummin isäntäsolulle homologinen signaali. Joitakin signaali-

lymfotoksiini-fuusioita isäntäsolu ei tunnista tai "prosessoi" N-päätteiseen, metionyyliittomaan lymfotoksiiniin. Sellaisilla yhteenliittymillä, jotka sisältävät mikrobiperäisiä signaaleja, on käyttöä esimerkiksi lymfotoksiini-immunogeeneina.

Huomattakoon, että ilmaus "mahdollinen" sytotoksisesta aktiivisuudesta tarkoittaa, että lymfotoksiiniin sisältyy polypeptidejä, jotka voidaan esim. entsyymaattisen hydrolyysin avulla zymogeenille analogisesta, inaktiivisesta tilasta muuttaa polypeptidi-fragmentiksi, jolla on toivottu biologinen aktiivisuus. Ilmauksen "mahdollinen" sytotoksisesta aktiivisuudesta in vitro tai in vivo, tarkoituksena on sulkea piiriinsä ei-sytotoksiset polypeptidit, jotka voidaan muuttaa, esim. entsyymaattisen hydrolyysin avulla, inaktiivisesta, zymogeenille analogisesta tilasta polypeptidifragmentiksi, jolla on määriteltävissä oleva biologinen aktiivisuus. Tyypillisesti, inaktiiviset prekursorit tulevat olemaan fuusio-proteiineja, joissa lymfotoksiini on peptidisidoksella karboksyyli-päästään sidottu toiseen proteiiniin tai polypeptidiin. Tähän peptidisidokseen rajoittuva tai sen lähellä sijaitseva sekvenssi on valittu siten, että se on herkkä proteolyyttiselle hydrolyysille, jotta lymfotoksiini vapautuu, joko in vivo tai osana valmistusmenetelmää, in vitro. Tyypillisiä kytkentä-sekvenssejä ovat lys-lys tai arg-lys. Ei-lymfotoksiini-komponentti, kuten esimerkiksi pro-lymfotoksiini, on edullisesti homologinen proteiiniin, niin että se vähentää fuusion immuunigeenisuutta. Homologisen proteiinin tulisi olla vaaraton eikä sen tulisi sitoutua solunpintoihin. Täten aikaan saadulla lymfotoksiinilla tulee sitten olemaan määriteltävissä oleva vaadittu sytotoksinen aktiivisuus.

Vaikka lymfotoksiinilla tavallisesti tarkoitetaan ihmisen lymfotoksiinia, hiireltä, sioilta, hevoselta tai härältä saatu lymfotoksiini sisältyy lymfotoksiini-

määritelmän piiriin, sikäli kuin se noudattaa yllä kuvattuja normeja homologisten alueiden ja biologisen aktiivisuuden suhteen. Esimerkiksi, härän ja hiiren lymfotoksiinien on havaittu olevan erittäin homologisia (noin 80 %:isesti) humaanilymfotoksiinin kanssa. Lymfotoksiini ei ole lajispesifinen, esim. humaanilymfotoksiini on aktiivinen hiiren kasvaimia ja neoplastisia solulinjoja kohtaan. Siitä syystä yhdestä lajista saatua lymfotoksiinia voidaan käyttää toisen lajin hoidossa.

10 Lymfotoksiiniin sisältyy myös multimeeri-muotoja. Lymfotoksiini aggregoituu spontaanisti multimeereiksi, tavallisesti dimeereiksi tai korkeammiksi multimeereiksi. Multimeerit ovat sytotoksisia ja sen mukaisesti ne soveltuvat käytettäväksi terapiaan in vivo. Lymfotoksiini ilmentyy rekombinantti-isännissä monomeerinä. Kuitenkaan lymfotoksiinilla ei ole jälkeempään taipumusta muodostaa spontaanisti multimeerejä. Homogeeniset multimeerit tai erilaisten multimeerien seokset ovat terapeuttisesti käyttökelpoisia.

20 Lymfotoksiinivariantteihin sisältyy ennalta määrättyjä tai kohdistettuja, esim. paikan suhteen spesifisiä, kuvion 2a esittämän molekyylin tai sen fragmenttien mutaatioita. Lymfotoksiinivariantit määritellään polypeptideinä, joilla muutoin on lymfotoksiiniin määritellyt ominaisuudet, paitsi että niille on ominaista aminohapposekvenssi, joka eroaa kuviossa 2a esitetystä sekvenssistä, joko tähteiden pois jättämisen, substituution tai insertion suhteen. Tässä yhteydessä kuvattuja ei-humaanilymfotoksiineja sekä humaanilymfotoksiinin alleleja pidetään varianttilymfotoksiineina, koska ne ovat paikkakohtaisia mutantteja, joilla ei ole mitään luonnossa esiintyvää kaksoiskappaletta. Mutaation kohteena on konstruoida DNA, joka koodittaa yllä esitetyn määritelmän mukaista lymfotoksiinia, mutta jolla on ominaisuuksia, jotka muuntavat luonnossa esiintyvän lymfo-

35

toksiinin biologista aktiivisuutta tai helpottavat lymfotoksiinin valmistusta. Esimerkiksi lysiini +89 kodoni läpikäy mutaation, jotta histidiini-tähde ilmentyy lysiini-tähteen tilalla. Histidiini +89 ei enää hydrolysoidu trypsiinillä (joka yleensä pilkkoo proteiinit arg-X- tai lys-X-sidoksen kohdalta). Proteaasiresistenssin odotetaan antavan mutantille suuremman biologisen puoliintumisajan kuin on laita lymfotoksiinin suhteen, jolla on kuvion 2a mukainen sekvenssi (tai sen fragmentti). Muut lymfotoksiinin lysiini- ja arginiini-tähteet saattavat mutantoitua histidiiniksi, kuten esimerkiksi lysiini +28, lysiini +19 tai arginiini +15.

Kuten yllä on esitetty, tietyillä lymfotoksiini-molekyylin alueilla on oleellista homologiaa samalla tavoin aktiivisen proteiinin kanssa, jota merkitään kasvainkuoliotekijäksi (tumor necrosis factor). Aminohappotähteet näissä pääkohdittain homologisissa sekä niitä välittömästi reunustavissa alueissa ovat edullisia mutaatiolle, jotka kohdistuvat lymfotoksiinimutanttien identifiointiin, joilla on poikkeavaa biologista tai sytotoksista aktiivisuutta. Sellaisia mutanteja valmistetaan sinänsä tunnetuin menetelmin, ja ne seulotaan halutun biologisen aktiivisuuden suhteen, esimerkiksi lisääntyneen sytotoksisuuden suhteen, tiettyä käsiteltävää kasvainta kohtaan tai, eläinten immunisointiin tarkoitetun lymfotoksiini-lajin ollessa kysymyksessä, kyvyn suhteen saada aikaan voimakkaampi immuunivaste. Esimerkkejä sellaisista lymfotoksiini-varianteista ovat seuraavat: Ala=168 on läpikäynyt mutaation haaraketjuiseksi aminohapoksi (val, ile tai leu); hydrofobinen aminohappo (esim. phe, val, ile tai leu) on insertion avulla sijoitettu thr+163:n ja val+164:n väliin; tyrosiinillä on korvattu thr+163; lysiinillä on korvattu ser+82; ser+42 on korvattu isoleusiinilla, leusiinilla, fenyylialaniinilla, valiinilla tai histidiinillä; lys+84 on korvattu glutamiinilla, tryptofaanilla, seriinillä

tai histidiinillä; ser+82 on poistettu; leu+171:een on
 liitetty hydrofobinen di- tai tri-peptidi; thr+163 on
 korvattu asparagiinihapolla tai lysiinillä; ala-lys on
 insertion avulla sijoitettu glu+127:n ja pro+128:n väliin;
 5 ser+70 on korvattu lysiinillä tai glysiinillä; thr+69
 on korvattu tyrosiinilla; lys+28 on korvattu arginiinilla
 tai histidiinillä; his+32 on korvattu arginiinilla tai
 lysiinillä; asp+36 on korvattu proliinilla, seriinillä,
 treoniinilla, tyrosiinilla tai glytamiinihapolla; ser+38
 10 on korvattu tyrosiinilla, metioniinilla tai glutamiini-
 hapolla; ser+61 on korvattu treoniinilla, tyrosiinilla,
 histidiinilla tai lysiinillä; gly+124 on korvattu aspara-
 giinihapolla, seriinillä tai tyrosiinilla; his+135 on
 korvattu arginiinilla, lysiinillä, tyrosiinilla, trypto-
 15 faanilla tai proliinilla; thr+142 on korvattu asparagii-
 nihapolla; ja gln+146 on korvattu lysiinillä tai treonii-
 nilla.

Erittäin halutun mutanttien ryhmän muodostavat mutan-
 tit, joista metioniini-tähteet humaanilymfotoksiini-
 20 tähteistä +20, +120 ja +133 on poistettu, tai, mielui-
 min, ne on substituoitu vastaavilla tähteillä, joita esiin-
 tyy muiden lajien lymfotoksiineissa, kuten esimerkiksi
 sellaisissa, joita kuvataan kyseessä olevan hakemuksen
 yhteydessä muualla. Esim. met+20, +120 ja +133 substituoii-
 25 daan vastaavasti treoniinilla, seriinillä ja valiinilla.
 Nämä ovat härän lymfotoksiinin vastaavat tähteet. Substi-
 tuutio saadaan aikaan esimerkissä 9 kuvatulla tavalla,
 paitsi että met+133 käy läpi mutaation val:ksi mutaation
 seuraavan vaiheen avulla, jossa käytetään M13 faagia si-
 30 nänsä tunnettujen menetelmien mukaisesti. Tätä eläinlaji-
 hybridilymfotoksiini-DNA-mutaattia käytetään esimerkin
 7 leusyylin amino-päättteenä käsittävän DNA:n tilalla, ja
 ilmentyy fuusiona. Tunnettuja menetelmiä noudattamalla
 syanogeenibromidia käytetään STII-signaalin lohkaisemi-
 35 seen hybridilymfotoksiinista, ja takaisin saadaan kypsä,
 leusyylin amino-päättteenä sisältävä lymfotoksiini.

Muita käyttökelpoisia lymfotoksiinivariantteja ovat ne, joissa kasvainkuoliotekijästä saadut tähteet korvaavat vastaavat lymfotoksiini-tähteet hybridien, kasvainkuoliotekijä-lymfotoksiini-varianttien valmistamiseksi. Tyypillinen esimerkki on korvata leusyyliamino-päänteisen lymfotoksiinin ensimmäiset 27 tähdettä kypsän kasvainkuoliotekijän ensimmäisillä 8:llä, 9:llä tai 10:llä tähteellä (esim. val-arg-ser-ser-ser-arg-thr-pro-ser-asp-). Tämän muunnoksen on todennäköisemmin oltava sellaisen, josta N-terminaalaisesti on poistettu metionyyli E. colissa tapahtuvassa suorassa ekspressiossa.

Niin kauan kuin mutaatio-kohta on ennalta määrätty, on tarpeetonta, että mutaatio sinänsä on ennalta määrätty. Esimerkiksi histidiini +89 lymfotoksiini-mutantin tehon optimoimiseksi, aikaansaadaan umpimähkäinen mutaatio lyysiini +89:n kodonissa ja ilmentyneet lymfotoksiini-mutantit seulotaan sytotoksisen aktiivisuuden ja proteaasiresistenssin optimiyhdistelmän suhteen.

Lymfotoksiini saattaa myös sisältää insertioita, tavallisesti noin 1 - 10 aminohappotähteen, tai noin 1 - 30 tähteen deletioita. Substituutiot, deletiot, insertiot tai mikä tahansa alayhdistelmä saatetaan yhdistää lopullisen rakenteen saamiseksi. Insertioihin sisältyvät amino- ja karboksyyli-päänteiset yhteenliittymät, esim. karboksyyli päähän lisätty hydrobobinen pidennys. Mieluummin kuitenkin suoritetaan ainoastaan substituutiomutaatio. Ilmeisesti, koodittavassa DNA:ssa sijaitsevia mutaatioita ei tule sijoittaa lukuraamin ulkopuolelle ja mieluummin ei muodosteta komplementaarisia alueita, jotka voisivat valmistaa sekundaarisen mRNA-rakenteen. E. colin uutteilla, jotka on transformoitu vektoreilla, jotka sisältävät DNA:a, joka koodittaa lymfotoksiini-mutantteja, joista puuttuu ainakin 16 karboksi-päänteistä aminohappoa tai joilta puuttuvat leusyyli-amino-päänteisen lymfotoksiinin ensimmäiset 33 aminopäänteistä tähdettä, ei ole sytotoksista

aktiivisuutta. Kuitenkaan syitä aktiivisuuden puuttumiseen ei tunneta, ja ne voivat olla mitkä hyvänsä esimerkissä 1 alempana esitetyistä syistä.

5 Kaikki mutaatiot DNA:ssa, joka koodittaa lymfotoksiinia, eivät ilmenny rekombinantti-soluviljelmän viimeisessä tuotteessa. Esimerkiksi, DNA-substituutio-mutanttien
10 pääluokan muodostavat ne DNA:t, joissa kuvion 2a esittämä erityssignaali on korvattu erilaisella erityssignaalilla, joko deleetioin 34, tähde-signaalin sisällä tai substituutioin, jotka vaihtavat useimmat tai kaikki alkuperäiset
15 signaalit signaaliksi, jonka aiottu isäntä todennäköisemmin tunnistaa. Esimerkiksi konstruoitaessa prokaryoottista ekspressiovektoria, kuvion 2a mukaiselle erityssignaalille suoritetaan deleetio bakteeriperäisen alkalisen fosfa-
20 taasin tai lämmön suhteen kestävän enterotoksiini II:n signaalien hyväksi ja hiivalla kuvion 2a mukainen signaali korvataan hiivan invertaasi-, alfa-tekijä- tai hapanfosfataasi-signaalien hyväksi. Tämä ei merkitse kuitenkaan
25 sitä, etteivät muut isännät kuin humaanisolulinjat tunnistaa ihmisperäistä erityssignaalia. kun isäntä "tunnistaa" erityssignaalin, yhteenliittynyt proteiini, joka käsittää lymfotoksiinin ja signaalin, tavallisesti pilkootaan signaali-lymfotoksiini-peptidisidoksen kohdalta samassa tapahtumassa, joka johtaa lymfotoksiinin erittymiseen. Täten, vieläpä vaikka DNA-mutanttia käytetään isännän transformaatioon, muodostuva lymfotoksiini-tuote saat-
30 taa olla joko yhteenliitetty tai alkuperäinen lymfotoksiini, riippuen isäntäsolun tehokkuudesta fuusio-tapahtumassa.

30 Eräs toinen DNA-mutanttien pääluokka, jotka eivät ilmenny lymfotoksiinivariantteina, ovat nukleotidisubstituutiot, jotka on tehty ilmentymisen lisäämiseksi, ensisijaisesti välttämällä stem-loop-rakenteita transkriboidussa mRNA:ssa (katso käsittelynalaista patenttihakemusta
35 U.S.S.N. 303 687, joka on tähän yhteyteen liitetty viit-

teenä) tai antamaan käyttöön kodoneja, jotka valittu isäntä voi helpommin transkriboida, esim. hyvin tunnetut E. coliin etusija(preferance)-kodonit E. coliin ilmentymistä varten.

5 Nukleiinihappomutantti valmistetaan sinänsä tunnetuin menetelmin (A. Hui et al., 1984, "the EMBO Journal" 3(3): 623 - 629; J. Adelman et al., "DNA" 2(3): 183 - 193; U.K. Patent Application 2 130 219A; G. Winter et al., 1982, "Nature" 299: 756 - 758; sekä R. Wallace et al., 1981, 10 "Nucleic Acids Research" 9(15): 3647 - 3656). Näihin menetelmiin sisältyy M13 faagimutaatio, lymfotoksiinin mutanttiseen synteesi esimerkissä 1 ynnä seuraavissa esimerkeissä kuvatulla tavalla tai muiden tunnettujen menetelmien mukaisesti.

15 Lymfotoksiinia koodittava nukleiinihappo on mikä tahansa DNA tai RNA, joka koodittaa polypeptidiä, joka kuuluu tässä yhteydessä määritellyn lymfotoksiinin piiriin, joko sen nukleotidisekvenssit vastaavat tai eivät vastaa luonnossa esiintyviä sekvenssejä. Lisäksi keksinnön 20 piiriin kuuluu nukleiinihappo, joka voi hybridisoitua, ainakin vähemmän ankarissa olosuhteissa, lymfotoksiinia koodittavaan nukleiinihappoon, vaikkakaan hybridisoitua nukleiinihappo ei koodita proteiinia, joka muutoin täyttää lymfotoksiinille määritellyt vaatimukset. Esimerkkinä 25 viimeksi mainitusta olisi koetin, joka polypeptidin, jota se koodittaa, lyhyiden vuoksi ei pysty ekspressoimaan biologisesti aktiivista lymfotoksiinia. Nukleiinihappo, joka koodittaa lymfotoksiinia tai voi sen lisäksi hybridisoitua, valmistetaan orgaanisen synteessin avulla, pääpiirteissään esimerkissä 1 kuvatulla tavalla, tai se 30 saadaan luonnossa esiintyvistä lähteistä tutkimalla geenin- tai cDNA-kirjastoja esimerkeissä kuvatulla tavalla.

Kyseessä olevan keksinnön mukainen lymfotoksiini valmistetaan menetelmällä, johon yleensä välttämättä 35 sisältyy isännän transformaatio vektorilla, jossa on haluttua lymfotoksiinia koodittava nukleiinihappo. Vekto-

rilla on replikoituva DNA-rakenne. Vektoreita käytetään tässä yhteydessä DNA:n laajentamiseen tai lymfotoksiinia koodittavan DNA:n ekspressioon. Ekspressiovektori on DNA-rakenne, jossa lymfotoksiinia koodittava DNA-sekvenssi on toiminnallisesti liitetty sopivaan säätelysekvenssiin, joka pystyy saamaan aikaan lymfotoksiinin ekspression sopivassa isännässä. Sellaisiin kontrollisekvensseihin sisältyy transkriptionaalinen säätelyalue (promoottori), valinnainen operaattorisekvenssi transkription kontrollointiin, sekvenssi, joka koodittaa sopivaa mRNA:n ribosomaalista sitoutumiskohtaa sekä sekvenssit, jotka säätelevät transkription ja translaation päättymistä.

Vektori saattaa olla plasmidi, virus tai liitettävissä oleva DNA-fragmentti (esim. rekombinaation avulla isäntään liitettävissä oleva geeniaines). Kun vektori on transformoitu sopivaan isäntään, vektori replikoituu ja toimii riippumattomana isännän geeniaineksestä, tai se saattaa, joissakin tapauksissa, integroitua geeniainekseen itseensä. Kyseessä olevassa hakemuksessa "plasmidia" ja "vektoria" käytetään joskus erotuksetta, vaikka plasmidi on tällä hetkellä yleisimmin vektorista käytetty muoto. Kuitenkin kaikki muut vektoreiden muodot, jotka ovat toiminnaltaan samanarvoisia ja jotka ovat tai tulevat olemaan tutkimustyössä tunnettuja, soveltuvat tässä yhteydessä käytettäväksi.

Sopivat vektorit sisältävät replikonin ja kontrollisekvenssejä, jotka ovat peräisin lajeilta, jotka sopivat yhteen aiotun ekspressioisännän kanssa. Transformoidut isäntäsolut ovat soluja, jotka on transformoitu tai transfektoitu lymfotoksiinivektoreilla, jotka on konstruoitu rekombinantti-DNA-tekniikkaa käyttämällä. Transformoidut isäntäsolut tavallisesti ilmentävät lymfotoksiinia. Ekspressoitu lymfotoksiini jää solun sisään tai se eritetään periplasmiseen tilaan tai viljelmän supernatanttiin, valitusta isäntäsolusta riippuen.

DNA-alueet ovat toteuttamiskelpoisesti kytkettyjä, kun ne ovat toiminnallisesti yhteen kuuluvia. Esim., esisekvenssiä tai erityisjohdantosekvenssiä vastaava DNA on toteuttamiskelpoisesti kytketty polypeptidiä vastaavaan DNA:an, jos se ilmentyy preproteiinina, joka osallistuu polypeptidin erittymiseen; promoottori on toteuttamiskelpoisesti kytketty koodaavaan sekvenssiin, jos se säätelee sekvenssin transkriptiota; tai ribosomin sitoutumiskohta on toiminnallisesti kytketty koodaavaan sekvenssiin, jos se sijaitsee siten, että se sallii translaation. Yleisesti sanottuna, toteuttamiskelpoisesti kytketty tarkoittaa viereistä ja, erityissekvenssin ollessa kysymyksessä, viereistä ja lukuvaihetta.

Sopivat isäntäsolut ovat prokaryootteja, hiivasoluja tai korkeampia eukaryoottisia soluja. Prokaryootteihin kuuluu gram-negatiivisia tai gram-positiivisia organismeja, esimerkiksi *E. coli* tai *Bacilli*. Korkeampiin eukaryoottisiin soluihin kuuluu aikaansaatuja, nisäkäsperäisiä solulinjoja alla esitetyn kuvauksen mukaisesti. Edullinen isäntäsolu on faagien suhteen resistentti *E. coli* W3110 (ATCC 27 325)-kanta, jota kuvataan esimerkeissä, vaikka muut prokaryootit, kuten esimerkiksi *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31 537), *E. coli* 294 (ATCC 31 446), *Pseudomonas*-lajit tai *Serratia marcescens* soveltuvat.

Lymfotoksiinin ekspressioon ovat edullisia prokaryoottiset isäntä-vektori-järjestelmät. Sopivia mikrobiperäisiä vektoreita on runsaasti saatavilla. Yleisesti sanottuna, mikrobiperäinen vektori sisältää replikaation alun, jonka aiottu isäntä tunnistaa, promoottorin, joka toimii isännässä sekä fenotyyppisen valintageenin, esimerkiksi geenin, joka koodittaa proteiineja, jotka antavat antibioottiresistenssin tai täydentävät auksotrofista vaatimusta. Samanlaisia rakenteita valmistetaan muita isäntiä varten *E. coli* transformoidaan tyypillisesti käyttämällä pBR322:a, plasmidia, joka on peräisin eräältä

E. coli-lajilta (Bolivar, et al., 1977, "Gene" 2:95). pBR322 sisältää geenejä ampicilliini- ja tetrasykliini-resistenssiä varten ja antaa täten käyttöön helppoja keinoja transformoitujen solujen identifioimiseksi.

- 5 Ekspressiovektoreiden täytyy sisältää promoottori, jonka isäntäorganismi tunnistaa, mutta jota kloonausvektoreiden ei tarvitse tunnistaa. Promoottori on yleensä homologinen aiotulle isännälle. Promoottoreihin, joita useimmin käytetään yhdistelmä-DNA-rakenteessa, kuuluu
- 10 β -laktamaasi (penisillinaasi) sekä laktoosipromoottorijärjestelmiä (Chang et al., 1978, "Nature", 275: 615; ja Goeddel et al., 1979, "Nature" 281: 544), tryptofaani (trp)-promoottorijärjestelmä (Goeddel et al., 1980, "Nucleic Acids Res." 8: 4057 sekä EPO App. Publ nro
- 15 36 776) ja tac-promoottori [H. De Boer et al., "Proc. Nat'l. Acad. Sci. U.S.A." 80: 21 - 25 (1983)]. Vaikka nämä ovat yleisimmin käytetyt, muut tunnetut, mikrobi-peräiset promoottorit ovat sopivia. Yksityiskohtia niitä koskevista nukleotidisekvensseistä on julkaistu, mikä
- 20 tekee asiantuntijoille mahdolliseksi kytkeä ne lymfotoksiinia koodittaviin plasmidivektoreihin (Siebenlist et al., 1980, "Cell" 20: 269) sekä lymfotoksiinia koodittavaan DNA:an. Tällä hetkellä edullinen vektori on pBR322-johdannainen, joka sisältää E. colin alkalisen fosfataasin pro-
- 25 moottorin Shine-Dalgarno-sekvenssin kanssa. Promoottori ja Shine-Dalgarno-sekvenssi ovat toiminnallisesti kytketyt lymfotoksiinia koodittavaan DNA:an, esim. ne sijaitsevat niin, että ne edistävät lymfotoksiini-mRNA:n transkriptiota DNA:sta.
- 30 Prokaryoottien lisäksi eukaryoottiset mikrobit, kuten esimerkiksi hiivaviljelmät transformoituvat lymfotoksiinia koodittavilla vektoreilla. Saccharomyces cerevisiae, eli tavallinen leipomohiiva, on yleisimmin käytetty alempien eukaryoottisten isäntämikro-organis-
- 35 mien joukossa, vaikka monia muita kantoja on yleisesti

saatavilla. Hiivavektorit sisältävät yleensä replikaation alun 2 mikronin hiivaplasmidista tai itsenäisesti replikoituvan sekvenssin (ARS), promoottorin, lymfotoksiinia koodittavan DNA:n (humaani pre-lymfotoksiini erityisesti
5 mukaan luettuna), sekvenssejä polyadenylointia sekä transkription päättymistä varten ja valintageenin. Lymfotoksiinin ekspressiolle sopiva geeni hiivassa on YRp7, (Stinchcomb et al., 1979, "Nature", 282: 39; Kingsman et al., 1979, "Gene", 7: 141; Tschemper et al., 1980,
10 "Gene", 10: 157). Tämä plasmidi sisältää jo trp1-geenin, joka antaa käyttöön valintamarkkerin hiivan mutanttikannalle, jolta puuttuu kyky kasvaa tryptofaanissa, esimerkiksi ATCC nro 44076:a tai PEP4-1:a varten (Jones, 1977, "Genetics", 85:12): trp1-vaurion läsnäolo hiivaisäntä-
15 solun perintötekijöissä antaa sitten käyttöön tehokkaan ympäristön transformaation havaitsemiseksi tryptofaanin poissaollessa.

Sopiviin promoottorisekvensseihin hiivavektoreissa sisältyvät promoottorit metallotioneiinille, 3-fosfoglyseraattikinaasille (Hitzeman et al., 1980, "J. Biol. Chem.", 255: 2073) tai muille glykolyttisille entsyymeille (Hess et al., 1968, "J. Adv. Enzyme Reg.", 7: 149; sekä Holland et al., 1978, "Biochemistry", 17: 4900),
20 kuten esimerkiksi enolaasille, glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasille, heksokinaasille, pyruvaattidekarboksilaasille, fosfofruktokinaasille, glukoosi-6-fosfaattisomeraasille, 3-fosfoglyseraattimutaasille, pyruvaattikinaasille, triosifosfaatti-isomeraasille, fosfoglukoosi-isomeraasille sekä glukokinaasille. Hiivassa tapahtuvaan
25 ilmentymiseen sopivia vektoreita ja promoottoreita kuvataan edelleen R. Hitzemanin et al. julkaisussa, et al. EPO Publ'n, nro 73 657.

Muut promoottorit, joilla on kasvutekijöiden säätelyn transkription lisäetu, ovat promoottorialueet alkoholidehydrogenaasi 2:lle, isosytokromi C:lle, happamelle
35 fosfataasille, hajoitettaville entsyymeille, jotka kytkey-

tyvät typen metaboliaan, sekä edellä mainitulle metallo-
tioneiinille ja glyseraldehydi-3-fosfaattidehydrogenaasille
samoin kuin entsyymeille, jotka vastaavat maltoosin ja
galaktoosin hyväksikäytöstä. Sopivia ekspressioplasmideja
konstruoitaessa, näihin geeneihin kytkeytyvät pääte-
sekvenssit liitetään myös lymfotoksiinia koodittavien
sekvenssien ekspressiovektori 3:een, jotta annetaan käyttöön
mRNA:n polyadenylaatio ja päätös.

Isäntinä voidaan myös käyttää mikro-organismien lisäksi
soluviljelmiä, jotka ovat peräisin monisoluisista organismeista.
Tämä ei kuitenkaan ole edullista, koska tähän saakka on saatu
mainioita tuloksia lymfotoksiinia ekspressoivilla mikrobeilla.
Kuitenkin periaatteessa mikä tahansa korkeampi eukaryoottinen
soluviljelmä, joka on peräisin joko vertebraatti- tai
invertebraattiviljelmästä, on sopiva. Mielenkiinto on kuitenkin
ollut suurinta vertebraattisoluja kohtaan, ja vertebraattisolujen
lisäämisestä viljelmissä (kudosviljelmä) on tullut viime vuosina
rutinomainen menetelmä [Tissue Culture, Academic Press, Kruse ja
Patterson, julkaisijat (1973)]. Käyttökelpoisten isäntäsolulinjojen
esimerkkejä ovat VERO- ja HeLa-solut, kiinalaisen hamsterin
munasarjan solulinjat (CHO) sekä WI38-, BHK-, COS-7- ja MDCK-
solulinjat. Sellaisten solujen ekspressiovektoreihin tavallisesti
sisältyy (jos on tarpeellista) replikaation alkukohta, joka sijaitsee
ekspressoitavan geenin yläpuolella, yhdessä ribosomin sitoutumiskohtan
kanssa, RNA:n sitoutumiskohta (jos käytetään intronin sisältävää
geeni-DNA:a), polyadenylaatio-kohta sekä transkriptionaalinen
päätesekvenssi.

Ekspressiovektoreissa sijaitsevat, transkription ja translaation
kontrollisekvenssit transformoivissa vertebraattisoluissa
tapahtuvaa käyttöä varten saadaan usein virusperäisistä
lähteistä. Esimerkiksi, yleisesti käytetyt promoottorit
ovat peräisin polyomasta, Adenovirus 2:lta ja mieluiten
Simian -virus 40:sta (SV40). Aikaiset ja myöhäiset
promoottorit ovat erityisen käyttökelpoisia,

koska molemmat saadaan viruksesta fragmenttina, joka sisältää myös SV40-virukselta peräisin olevan replikaation alkukohdan (Fiers et al., 1978, "Nature"; 273: 113). Voidaan myös käyttää pienempiä tai suurempia SV40-fragmentteja, edellyttäen että niihin sisältyy suunnilleen 250 bp-sekvenssi, joka ulottuu Hind III-kohdasta Bgl I-kohtaa kohti, joka sijaitsee replikaation virusperäisessä alkukohdassa. Edelleen on myös mahdollista ja usein myös toivottavaa käyttää hyväksi humaanigeenistöön sisältyvää promoottori-, kontrolli- ja/tai signaalsekvenssejä, jotka normaalisti liittyvät lymfotoksiiniin, sillä edellytyksellä että sellaiset kontrollisekvenssit ovat isäntäsolusysteemin kanssa yhteensopivia.

Replikaation alkukohta saatetaan antaa käyttöön joko konstruoimalla vektori, johon sisältyy eksogeeninen alkukohta, esimerkiksi se saattaa olla peräisin SV40- tai muusta viruslähteestä (esim. Polyoma, Adenovirus, VSV tai BPV), tai sen antaa käyttöön isäntäsolun kromosomaalinen replikaatiomekanismi. Jos vektori yhdistetään isäntäsolukromosomiin, viimeksi mainittu on usein riittävä. Lymfotoksiinia valmistetaan usein ilman amino-päätteistä metionyyliä, transformoimalla korkeampia eukaryoottisia soluja humaanipre-lymfotoksiini-DNA:lla.

Edullista nisäkäsisäntäsolua valittaessa transfektiota varten, joka suoritetaan vektoreilla, jotka käsittävät sekä lymfotoksiinin että dihydrofolaatireduktaasia (DHFR) koodittavia DNA-sekvenssejä, on sopivaa valita isäntäkäytetyn DHFR-proteiinin mukaisesti. Jos käytetään tyyppiltään villiä DHFR-proteiinia, on edullista valita isäntäsolu, jolta puuttuu DHFR ja joka täten tekee mahdolliseksi DHFR:a koodittavan sekvenssin käytön onnistuneen transfektion markkerina selektiivisessä elatusaineessa, josta puuttuvat hypoksantiini, glysiini sekä tymidiini. Tässä tapauksessa sopiva isäntäsolu on kiinan hamsterin munasarja-

solulinja (CHO), josta puuttuu DHFR-aktiivisuus, joka on

valmistettu ja joka lisääntyy Urlaubin ja Chain kuvaamalla tavalla, 1980, "Proc. Natl. Acad. Sci." (USA) 77: 4216.

Toisaalta, jos DHFR-proteiinia, jolla on alhainen sitoumisaffiniteetti metotreksaattia (MTX) kohtaan, koodittavaa DNA:a käytetään kontrollointisekvenssinä, ei ole tarpeellista käyttää DFR:lle resistenttejä soluja. Koska DHFR-mutantti on resistentti MTX:lle, MTX:a sisältävää elatusainetta voidaan käyttää valintakeinona edellyttäen, että isäntäsolut itse ovat MTX:lle herkkiä.

10 Useimmat eukaryoottiset solut, jotka voivat absorboida MTX:a, näyttävät olevan herkkiä metotreksaanille. Eräs sellainen käyttökelpoinen solulinja on CHO-linja, CHO-K1 (ATCC nro CCL 61).

Transformoidut isäntäsolut ovat soluja, jotka ovat transformoituja tai transfektoituja yhdistelmä-DNA-tekniikkaa käyttämällä konstruoiduilla lymfotoksiinivektoreilla. Transformoidut isäntäsolut tavallisesti ekpressoivat lymfotoksiinia. Ilmentynyt lymfotoksiini jää tavallisesti säilytettäväksi solunsisäisesti.

20 Lymfotoksiini saadaan takaisin ei erittävien solujen rekombinanttiviljelmistä hajottamalla solut ja poistamalla partikkeliaines sentrifugoimalla yms. tavalla. Lymfotoksiinia erittävät solut erotetaan viljelmäsupernatantista sentrifugoimalla. Kontaminoitunut lymfotoksiiniliuos puhdistetaan sitten yllä viitatuin menetelmin tai esimerkiksi 4 alla kuvatun immunoaffiniteettimenetelmän mukaisesti. Lymfotoksiini puhdistetaan sellaiseksi, että se soveltuu farmakologiseen käyttöön, ja se saatetaan sopiviksi annosmuodoiksi, esim. pulloihin tai ruiskuihin.

25 Mieluiten lymfotoksiini lyofilisoidaan pitkiä varastointiaikoja varten tai se saatetaan panna vesiliuokseen stabilisaattoreiden ja täyteaineiden kanssa, esimerkiksi isotoniseen keittosuolaliuokseen, ja antaa potilaille B. Aggarwal et al.:n kuvaamalla tavalla, European Patent

30 Application 100641.

35

Lymfotoksiinikoostumuksia annetaan kasvaimia kantaville eläimille. Antaminen suoritetaan tunnettujen menetelmien mukaisesti, esim. laskimonsisäisenä, intraperitoneaalisenä, ihonalaisena, lihaksensisäisenä, vammansisäisenä, steriileiden lymfotoksiiniliuosten infuusioina tai ruiskeina tai alla kuvattuja, hidastettuja vapautumisjärjestelmiä käyttäen. Lymfotoksiinia annetaan vaurionsisäisesti, esim. suorana injektiona kiinteisiin kasvaimiin. Hajapesäkkeisten kasvaimien, kuten esimerkiksi leukemian ollessa kysymyksessä, annostelu suoritetaan mieluummin laskimonsisäisesti tai lymfajärjestelmään. Vatsaelinten kasvaimia, kuten esimerkiksi munarauhassyöpää käsitellään edullisesti vatsaontelonsisäisen infuusion avulla, käyttämällä vatsakalvodialyysilaitteistoa sekä vatsakalvon kanssa yhteen sopivia liuoksia. Tavallisesti kuitenkin lymfotoksiini annetaan jatkuvana infuusiona, vaikka bolusinjektio hyväksytään.

Haluttaessa lymfotoksiini annostellaan implantoidusta, hitaasti luovuttavasta valmisteesta. Esimerkkeihin proteiineille, joilla on lymfotoksiinidimeerin tai -trimeerin molekyylipaino, soveltuvista järjestelmistä kuuluvat L-glutamiinihapon ja γ -L-glutamaatin kopolymeerit (U. Sidman et al., 1983, "Biopolymers" 22 (1): 547 - 556), poly-(2-hydroksietyyli-metakrylaatti) (R. Langer et al., 1981, "J. Biomed. Mater. Res. 15: 167 - 277 sekä R. Langer, 1982, "Chem. Tech." 12: 98 - 105) tai etyleenivinyyliasettaatti (R. Langer et al., Id.). Lymfotoksiinia sisältävät valmisteet implantoidaan leikkauskohtiin, joista kasvaimet on poistettu. Vaihtoehtoisesti lymfotoksiini kapseloidaan semipermeaabeleihin mikrokapseleihin tai liposomeihin kasvaimen suoritettavaa injektiota varten. Tämä annostelutapa soveltuu erityisesti, kun kysymyksessä ovat kasvaimet, joita ei voida leikata, esimerkiksi aivokasvain-

Annosteltavan lymfotoksiinin määrä riippuu esimerkiksi annostelutiestä, kysymyksessä olevasta kasvaimesta

sekä potilaan tilasta. Hoitavalle lääkärille on välttämätöntä määrittää annoksen tiitteri ja muuntaa annostelutietä tarvittaessa, jotta saadaan optimaalinen sytotoksinen aktiivisuus kohteena olevaa kasvainta vastaan, kuten
5 esimerkiksi voidaan määrittää kasvaimen biopsian avulla tai oletetuille syöpämarkkereille, kuten esimerkiksi karsinoembryonaaliselle antigeenille soveltuvilla diagnostisilla määritysmenetelmillä, ottaen huomioon suurilla annoksilla tavattu rekombinanttitoksisuus. Tavallisesti
10 rekombinanttilymfotoksiini-annosten hiirellä, jotka ovat noin 50 - 200 $\mu\text{g/kg}$ ruumiinpainoa/päivä, laskimonsisäisesti annettaessa, on havaittu olevan pääpiirteissään myrkyttömiä ja tehokkaita in vivo. Ilmeisesti annosohjeet vaihtelevat eri eläimillä.

15 Kyseessä olevan keksinnön mukaisesti annetaan käyttöön menetelmä lymfotoksiinia neutraloivan vasta-aineen saamiseksi. Neutraloiva vasta-aine määritetään vasta-aineeksi, joka pystyy immunologisesti sitomaan kyseessä olevan keksinnön yhteydessä määritellyn lymfotoksiinin
20 siten, että se tuntuvasti vähentää lymfotoksiinin aktiivisuutta sytostaattisissa tai sytolyyttisissä lymfotoksiinin aktiivisuusmäärityksissä, kuten esimerkiksi alla kuvatussa hiiri L929:llä suoritettussa määrityksessä. Se seikka, että vasta-aine pystyy neutraloimaan lymfotoksiiniaktiivisuuden, ei tarkoita, että vasta-aineen pitää
25 sitoutua suoraan lymfotoksiinin aktiiviseen tai reseptoria sitovaan kohtaan. Vasta-aine saattaa tuntuvasti neutraloida lymfotoksiinin aktiivisuutta, jos se steerisesti sitoutuu alueeseen, joka on viereinen kriittiselle kohdalle, esim. konformaation kannalta viereinen eikä välttämättä viereinen aminohapposekvenssin kannalta katsottuna.
30

Yritettäessä valmistaa neutraloiva, monoklonaalinen vasta-aine lymfotoksiinia vastaan, näytti vaikealta immunisoida hiiriä sillä tavalla, että lymfotoksiinia neutraloiva
35 vasta-aine syntyy tai se herätetään eläimissä. Immunisointi lymfoblastiperäisellä lymfotoksiinilla eikä glu-

- tardehydriin kanssa ristiinkytkeytyllä lymfotoksiinilla tuottanut mitään havaittavaa määrää neutraloivaa vasta-ainetta immunisoidun hiiren seerumissa, ei vaikka hiirtä käsiteltiin ei neutraloivalla anti-lymfotoksiini-vasta-
- 5 aineella, joka voitiin havaita immunologisessa entsyymimäärityksessä. Kuitenkin, lymfotoksiini-aluna (aluminiumhydroksidi tai aluminiumoksidi, $\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) -adsorptio-
- 10 kompleksi synnyttää neutraloivan vasta-aineen vieläpä eläimissä, joiden on epäonnistunut kehittää aktiivisuutta ennen alunakompleksilla suoritettua immunisointia. Alunan valmistus ja sen käyttö antiseerumin valmistuksessa on julkaistu kirjassa C. Williams, et al., julkaisijat, 1967, Methods in Immunology and Immunochemistry I, ss. 197 - 229.
- 15 On suoritettu neutraloivaa vasta-ainetta valmistavien, eläimiltä saatujen pernasolujen fuusio hiiren myelomasolujen kanssa. Keskimäärin on ollut kloonattava noin 50 - 100 kloonia yhden kloonin identifioimiseksi, joka syntetisoi neutraloivaa vasta-ainetta. Kloonien seulontamenetelmä halutun aktiivisuuden suhteen on rutiinimainen ja kuuluu tavanomaisten taitojen piiriin ja jonka voi helposti toistaa vähäisin vaivannäöin.
- 20 Immunisoidusta eläimestä saatu seerumi, plasma tai IgG-jakeet sekä immunoglobuliinit, jotka ovat erittyneet hybridoma-soluista, jotka on kehitetty immunisoidujen eläinten perna- ja lymfasoluista, tyydyttävät keksinnön mukaisen käytön. Edullisessa patentin suoritusmuodossa neutraloiva vasta-aine saadaan oleellisesti muusta hybridoma-viljelmässä esiintyvästä anti-lymfotoksiini-
- 30 vasta-aineesta vapaana.
- : Neutraloiva vasta-aine tehdään liikkumattomaksi adsorboimalla se pintoihin, esimerkiksi muoviin, kuten polystyreeniin, tai sitomalla kovalenttisesti sideaineisiin, kuten syanogeenibromidilla aktivoituun Sepharoseen.
- 35 Sitten sitä käytetään immunologisiin määrityksiin tai

immunoaffiniteetin avulla suoritettavaan puhdistukseen. Koska vasta-aine on neutraloiva vasta-aine, on mitä sopivinta adsorboida se ja ilmaista biologisesti aktiivinen lymfotoksiini tai sen fragmentit. Vasta-aine on erityisen
5 käyttökelpoinen immunoradiometrisissä ("sandwich"), immunologisissa määrittämenetelmissä yhdessä ei neutraloivan anti-lymfotoksiini, monokloonisen vasta-aineen tai polyklonaalisen antiseerumin kanssa, joka sisältää ei neutraloivan anti-lymfotoksiinin. Immunologinen määrittäminen suoritetaan käyttämällä joko neutraloivaa tai ei neutraloivaa
10 vasta-ainetta merkattuna komponenttina, mikä merkkäus on tehokas havaittavan aineen kanssa, kuten esimerkiksi fluoroiva, kemiluminoiva tai radioisotooppileimaus, tunnettujen menetelmien mukaisesti. Kompetitiivisiä lymfotoksiinin määrittämenetelmiä varten lymfotoksiini merkataan
15 samalla tavalla. Kloramiini-T:n avulla suoritettu radiojodeeraus soveltuu sekä lymfotoksiini- että lymfotoksiinin vasta-aine-merkkiaineen valmistukseen, tai käytetään menetelmiä, joita on kuvattu julkaisussa J. Klostergaard et al., "Mol. Immun." 18: 455 (1980).
20

Esimerkkien yksinkertaistamiseksi, tiettyihin usein esiintyviin menetelmiin viitataan pikakirjoitusilmaisin.

Plasmideja merkitään pienellä kirjaimella p, joka on ensiksi ja/tai jota seuraavat suuret kirjaimet ja/tai
25 numerot. Kyseessä olevassa keksinnössä käytettyjä aloitusplasmideja on kaupallisesti saatavissa, niitä on julkisesti saatavissa rajoittamattomasti tai ne voidaan konstruoida sellaisista saatavissa olevista plasmideista julkaistujen menetelmien mukaisesti. Muut samanarvoiset plasmidit ovat
30 tutkimustyössä tunnettuja ja ovat selviä työn suorittajalle.

DNA:n "hajottaminen" (digestion) tarkoittaa DNA:n pilkkomista entsyymillä, joka vaikuttaa ainoastaan DNA:n tiettyihin kohtiin. Sellaisia entsyymejä nimitetään restriktioentsyymeiksi, ja kohdat, joille ne ovat spesifisiä,
35

ovat nimeltään restriktiokohtia. "Osittainen" hajottaminen tarkoittaa epätäydellistä hajottamista restriktioentsyymien avulla, esim. olosuhteet on valittu siten, että tuloksena on joidenkin, mutta ei kaikkien restriktio-

5 endonukleaasille alttiiden kohtien pilkkoutuminen DNA-substraatissa. Erilaiset restriktioentsyymit, joita tässä yhteydessä käytetään, ovat kaupallisesti saatavissa, ja käytettiin niiden reaktio-olosuhteita, kofaktoreita sekä muita vaatimuksia, jotka entsyymien toimittaja oli

10 ilmoittanut. Restriktioentsyymejä merkitään tavallisesti lyhennyksin, jotka koostuvat isoista kirjaimista, joita muut kirjaimet seuraavat ja sitten yleensä numerosta, joka edustaa mikro-organismia, josta kukin restriktioentsyymi on alunperin otettu. Yleensä käytetään noin 1 μ g plasmidia tai DNA-fragmenttia noin yhden yksikön kanssa entsyymiä noin 20 μ l:ssa puskuriliuosta. Valmistaja määrää tarkoin tietyille restriktioentsyymeille sopivat puskurit ja substraatin määrät. Tavallisesti käytetään noin 1 tunnin inkubaatioaikoja 37°C:ssa, mutta niitä saatetaan muuttaa

20 toimittajan ohjeiden mukaisesti. Inkuboinnin jälkeen proteiini poistetaan uuttamalla fenolilla ja kloroformilla, ja hajotettu nukleiinihappo saadaan takaisin vesijakeesta saostamalla se etanolilla. Restriktioentsyymillä suoritettua hajottamista seuraa harvoin 5' -päätteisten fosfaattien hydrolyysi bakteeriperäisellä alkalisella fosfataasilla, jotta estetään DNA-fragmentin kahden, restriktion avulla leikatun päään yhtyminen renkaaksi tai muodostamasta silmukkaa, mikä estäisi toisen DNA-fragmentin insertion restriktio-kohtaan. Jollei muuten ole mainittu, plasmidien hajottamista ei seuraa 5' -päätteisen fosforin poistaminen. Defosforylaation menetelmät ja reagenssit ovat tavanomaisia (T. Maniatis et al., 1982, Molecular Cloning ss. 133 - 134):

35 DNA:n tietyn fragmentin "takaisin saaminen" tai "eristäminen" restriktio-hajotustuotteesta tarkoittaa

hajotustuotteen erottamista polyakryyliamidigeelielektroforeesin avulla, kiinnostavan fragmentin identifiointia vertaamalla sen liikkuvuutta markkeri-DNA-fragmenttien, joiden molekyylipaino tunnetaan, liikkuvuuteen, poistamalla halutun fragmentin sisältävä geelipala ja erottamalla DNA geelistä. Tämä menetelmä on yleisesti tunnettu. Esimerkiksi katso R. Lawn et al., 1981, "Nucleic Acids Res." 9: 6103 - 6114, sekä D. Goeddel et al., 1980, "Nucleic Acids Res." 8:4057.

10 "Southern Analysis" on menetelmä, jolla DNA-sekvenssien läsnäolo hajotustuotteessa tai sen DNA:a sisältävä koostumus varmistetaan hybridisaation avulla tunnettuun merkattuun oligonukleotidiin tai DNA-fragmenttiin. Kyseessä olevan keksinnön yhteydessä, jollei muutoin ole mainittu, 15 Southern-analyysi tarkoittaa hajotustuotteen erottamista 1 %:isella agarosilla, denturointia ja siirtämistä nitroselluloosalle E. Southernin menetelmän avulla, E. Southern, 1975, "J. Mol. Biol." 98:503-517, sekä hybridisaatiota T. Maniatisin et al.:n kuvaamalla tavalla, 1978, "Cell" 20 15:687-701.

"Transformaatio" tarkoittaa DNA:n viemistä organismiin, niin että DNA replikoituu, joko kromosomin ulkopuolisena aineksena tai kromosomin kokonaisuuden osana. Jollei muuten ole mainittu, tässä yhteydessä E. coli:n transformatioon käytetty menetelmä on CaCl_2 -menetelmän, jonka Mandel et al. ovat julkaisseet, 1970, "J. Mol. Biol." 53:154.

30 "Sidonta" tarkoittaa menetelmää, jossa muodostetaan fosfodiesterisidos kaksisäikeisten nukleinihappofragmenttien väliin (T. Maniatis et al., Id., s. 146). Ellei muuten mainita, sidonta suoritetaan tunnettuja puskureita ja olosuhteita käyttäen 10 yksiköllä T4 DNA-ligaasia ("sitojaa") 0,5 μg :a kohti noin ekvimolaarista määrää sidottavia DNA-fragmentteja.

35 DNA:n "valmistaminen" transformanteista tarkoittaa palsmidi-DNA:n eristämistä mikrobiviljelmästä. Ellei muu-

ten ole mainittu, käytetään Maniatis et al.:n alka-
lista/SDS-menetelmää, Id. s. 90.

"Oligonukleotidit" ovat lyhyitä, yksi- tai kaksi-
säikeisiä polydeoksinukleotidejä, jotka syntetisoidaan
5 kemiallisesti menetelmän avulla, joka on liitetty viit-
teenä esimerkkiin 1, ja sitten ne puhdistetaan polyak-
ryyliamidigeeleillä.

Kaikki kirjallisuuslainaukset on vartavasten lii-
tetty viitteinä.

10 Esimerkki 1

Lymfotoksiinin sekvensointi ja puhdistus

Humaanilymfoblastisolulinja RPMI-1788 (ATCC nro
CCL-156) kasvatettiin 15 litran vetoisissa pyörivissä
pulloissa 4×150^5 solun solutiheyteen millilitrassa,
15 käyttämällä seerumitonta elatusainetta (RPMI-1640). Lymfo-
toksiini indusoitiin 10 - 20 -kertaiseksi (500 - 1000
lymfotoksiiniyksikköön millilitraa kohti, alla kuvatulla
tavalla määritettynä) yli perustasojen sisällyttämällä
20 ng/ml forbolimyrastaattiasetaattia seerumittomaan
20 RPMI-1640-elatusaineeseen. 65 tunnin mittaisen viljelyn
jälkeen solut koottiin suodattamalla, ja suodoksen lymfo-
toksiiniaktiivisuus absorboitiin lasipalloihin, joilla
oli määrätty huokoskoko (Electronucleonics) ja jotka oli-
vat pylväässä (5 cm x 20 cm), tasapainotettiin 5mM fos-
faattipuskurilla (pH 7,4) sekä eluoitiin 50 %:isella ety-
25 leeniglykolilla, joka oli 5mM fosfaattipuskurissa
(pH 7,4). Kaikkiin puskureihin koko puhdistuksen ajan
sisällytettiin 0,1 mM fenyyylimetyylisulfonyylifluoridia
(PMSF), proteaasi-inhibiittoria sekä 1 mN natriumatsidia
30 mikrobikasvun inhiboimiseksi. Lasipalloista saatu eluaatti
sisälsi 84 000 yksikköä lymfotoksiinia/mg proteiinia.
Tämän jälkeen seurasi DEAE-selluloosakromatografia, len-
tiililektiini-Sepharose-kromatografia ja preparatiivinen,
alkuperäinen PAGE, B. Aggarwal et al.:n kuvaamalla tavalla,
35 1984, "J. Biol. Chem." 259 (1) : 686 - 691. Sytotoksisesta

aktiivisuudesta vastaavan proteiinin homogeenisuus määritettiin SDS-PAGE:n avulla, käänteisfaasi HPLC:llä Lichrosorb RP-18-pylväässä sekä aminopääte-sekventoinnin avulla.

Tämä lymfotoksiinivalmiste sisälsi enemmän kuin
5 95 paino-% leusyyli-amino-päätteistä lymfotoksiinia, jonka
likimääräinen molekyylipaino on 25 000 SDS-PAGE:llä määri-
tettynä. N-terminaalisen leusyyli-tyyppisen proteiinikompo-
nentin teoreettinen molekyylipaino on 18 664 daltonia;
jäljelle jäävä, likimäärin 6 500 daltonin osa oli liittyy-
10 nyt glykosyyli-sivuketjuun Asn+62:n kohdalla ja mahdolli-
sesti muihin O:n välityksellä kytkettyihin sokeritähteisiin.
Kudosviljelmäsupernatantti sisälsi tämän tyyppin oletettuja
multimeerejä (60 000 Da TSK-HPLC:llä määritettynä tai
64 000 Da Sephadex G-100 kromatografian perusteella).

15 Jäljelle jäävä 5 %:n osa lymfotoksiiniseosta oli
N-päätteisesti histidyylityyppiä, jonka molekyylipaino
oli noin 20 000. Molemmilla tyypeillä on suurin piirtein
sama sytolyttinen aktiivisuus, ainakin niissä vaihtelu-
rajoissa, jotka ovat luontaiset hajotettujen hiiren fibro-
20 blastisolujen alla kuvatuille määritysmenetelmille.

Koskemattomien lymfotoksiinimolekyylien käsittely
trypsiinillä tuotti ainoastaan joitakin fragmentteja. His-
tidyyl-amino-päätteinen lymfotoksiini hajotettiin kahteen
fragmenttiin aminohappojen 89 ja 90 välistä, kun taas
25 leusyyli-amino-päätteisen lymfotoksiinin trypsiinikäsittely
tuotti neljä fragmenttia, jotka oli pilkottu asemissa 15
ja 16, 19 ja 20 sekä 89 ja 90.

Mikrosekventointi Edmanin hajoitustekniikalla tuotti
koskemattoman molekyylin sekä trypsiinikäsittelyllä saatu-
30 jen fragmenttien sekvenssiä koskevaa tietoa.

Sekvenssiä koskevaa lisätietoa antoivat lymfotoksiin-
nin fragmentit, jotka saatiin karboksipeptidaasi P:llä
sekä kymotrypsiinillä suoritettun hajottamisen avulla, etik-
kahapolla suoritettulla uuttamisella ja syanogeenibromidilla
35 aikaansaadulla pilkkomisella. Tällä menetelmällä määritet-
tiin humaanilymfotoksiinin lähes koko sekvenssi. Amino-

päätteestä määritettiin 156 viereistä tähdettä. Tämän sekventointia koskevan informaation perusteella oli selvää, että kahden lymfotoksiinilajin välinen ero perustui 23 amino-päätteisen tähteen sijaintiin leusyyli-amino-

5 päätteisissä lajeissa, mitä ei havaittu histidyyli-amino-päätteisissä lajeissa. Karboksi-päätteinen sekvenssi ensimmäisten kolmen tähteen toisella puolella todettiin vaikeiksi määrittää tällä alueella sijaitsevien tiettyjen peptidisidosten sekä tähteiden hydrofobisen luonteen vuoksi.

10 Suunniteltiin synteettinen geeni, joka koodaisi proteiinisekvenssin mikro-sekventoinnin määrittelyssä laajuudessa. Rakennettu geeni sisälsi yleisen E. colin kodoni-kaiteleen, tämä merkitsee, ettei sekvenssissä käytetty harvoin käytettyjä E. colin kodoneita. Edulliset

15 humaanikodonit toimivat sijaisina siellä, missä mikään E. colin kodoni-kaistale ei ollut näkyvä. Tämä kaistale valittiin auttamaan ilmentymistä E. colissa ja myös siten, että synteettinen geeni olisi käyttökelpoinen koettimena luonnossa esiintyvän DNA-sekvenssin identifioimiseksi

20 humaani-cDNA:sta tai geenikirjastoista. Sekvenssiin rakennettiin ainutlaatuiset restriktio-kohdat XbaI, BamHI, HindIII sekä BglII, fragmenttien rakentamisen helpottamiseksi ja geenin tulevan manipulaation mahdollistamiseksi.

25 58 alkuperäistä oligomeeriä, jotka suunniteltiin synteettistä lymfotoksiinigeeniä varten, syntetisoitiin kiinteä faasi-fosfiittimenetelmällä, jonka ovat esittäneet M. Matteucci et al., 1981, "J. Amer. Chem. Soc." 103: 3185 - 3190 sekä S. Beaucage et al., 1981., 1981, "Tet. Letters" 22: 1859 - 1862. Näiden oligomeerien koko ulottuu 16 emäksestä 20 emäkseen, ja se on esitetty kuviossa

30 la. Limittäin menevät osat oligomeerien välillä olivat kuuden emäksen pituisia ja ne rakennettiin ainutlaatuisiksi. Koko geeni koottiin kuviossa 1b esitetyllä tavalla.

Geeni rakennettiin kolmessa erillisessä osassa.

35 Ensimmäinen, segmentti A, oli 117 emäsparia pitkä, ja se edusti leusyyli-aminopäätteisten lajien amino-terminaali-

sen pään 5'-koodittavaa aluetta. Segmentti B edusti lymfotoksiinimolekyylin keskiosaa koodittavaa DNA:a, ja se oli pituudeltaan 145 emäsparia. Segmentin C, joka oli pituudeltaan 217 emäsparia, uskottiin koodittavan lymfotoksiinin karboksi-päässä kaikkia aminohappotähteitä, 16 lukuunottamatta. Oligomeerit, joita tarvitaan kunkin segmentin syntetisointiin, puhdistettiin elektroforeesin avulla ja sitten ne poolattiin. Kullekin oligomeerille valittu suhteellisen pieni koko (se on 16 - 20 emästä) valittiin virheiden vähentämiseksi synteessissä.

Oligomeerien kukin ryhmä fosforyloitiin reaktiossa, joka sisälsi 20 mM Tris-HCl:a (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$:a, 20 mM ditiotreitolia, 0,5 mM ATP:a sekä 15 yksikköä T4-polynukleotidikinaasia 50 μ l:n tilavuudessa; reaktioon sisältyi arviolta 50 pikomoolia kutakin oligomeeriä. 30 minuutin kuluttua 37°C:ssa, reaktioseosta kuumennettiin 65°C:een kinaasiaktiivisuuden tuhoamiseksi, ja sitten sen annettiin hitaasti jäähtyä 20°C:een noin yhden tunnin pituisena aikana. Sitten fosforyloidut oligomeerit sidottiin lisäämällä 10 yksikköä T4-DNA-ligaasia ja reaktion annettiin tapahtua kahden tunnin ajan 20°C:ssa. DNA-ligaasi inaktivoitiin lämmön avulla, ja sen jälkeen sidottuja oligomeerejä uutettiin 3 tunnin ajan 37°C:ssa restriktioendonukleaasien kanssa, jotka tunnistivat rakennetut terminaaliset kohdat (e.g. XbaI ja BamHI segmentille A). Kutakin segmenttiä vastaavat fragmentit eristettiin 7 %:isella polyakryyliamidilla suoritettulla elektroforeesilla. Fragmentit, joilla oli oikea liikkuvuus, identifioitiin kunkin segmentin suhteen värjäämällä etiniumbromidilla sekä elektroeluoimalla geelistä. pFIFtrp69 (D. Goeddel et al., 1980, "Nature" 287: 411 - 416 tai Crea et al., European Patent Application 0048970) hajotettiin XbaI:n ja BamHI:n avulla, ja suuri vektorifragmentti eristettiin 6 %:isella polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Noin 50 ng segmentti A:a sidottiin pFIFtrp69-fragmenttiin. Samalla tavalla segmentti

b sidottiin BamHI:lla sekä HindIII:lla hajotettuun pBR322:een ja segmentti C sidottiin HindIII:lla ja BglII:lla hajotettuun pLeIFA-125-1:een (D. Geoddel et al., 1980, "Nuc. Acids Res." 8: 4057 - 4073). Sidontareaktioseos trans-
5 formoitiin E. coli ATCC 31446:een, ja syntyvät rekombinanttiplasmidit karakterisoitiin restriktioendonukleaasi-analyysin avulla ja DNA:a sekventoivalla Maxamin ja Gilbertin kemiallisella hajottamismenetelmällä. Viisi kuudesta segmentti A-kloonista sisälsi suunnitellun sekvenssin.
10 Eristettiin neljä segmentti B-plasmidia ja neljä segmentti C-plasmidia, ja kaikilla näillä inserteillä oli oikeat sekvenssit. Kukin segmentti eristettiin hajottamalla restriktioendonukleaaseilla, jotka tunnistivat terminaaliset kohdat, ja sitten ne sidottiin plasmidivektoriin pFIFtrp69, joka
15 oli käsitelty XbaI:llä ja BglII:lla. Syntyvä rekombinanttiplasmidi, pLTXB1 karakterisoitiin sekventoimalla insertoitu XbaI-BglII-fragmentti, joka sisälsi kuviossa la esitetyn sekvenssin.

Sen seikan määrittämiseksi, valmistaisiko synteet-
20 tinen geeni todella biologisesti aktiivista lymfotoksiinia, kasvatettiin E. coli pLTXB1:n transformantteja minimaalissa elatusaineessa, sellaisissa olosuhteissa, joissa trp-promoottorin tukahduttava vaikutus poistuu ja jotka sallivat synteettisen lymfotoksiinigeenin ekspression. Viljelmiä
: 25 kasvatettiin 1,0:n optiseen tiheyteen 550 nanometrissä, ja ne koottiin sentrifugoimalla. Solusaostuma lietettiin yhteen kymmenesosatilavuuteen, ja sitten solut rikottiin äänikäsittelyn avulla.

Lymfotoksiinin aktiivisuus määritettiin muunnetulla
30 solun hajottavalla menetelmällä, jonka B. Spofford on julkaissut 1974, "J. Immunol." 112: 2111. Lyhyesti sanottuna, hiiri L-929:n fibroblastisoluja kasvatettiin mikrotiitterilevyillä aktinomysiini D:n läsnäollessa. 12 - 18 tunnin kuluttua kuhunkin kammioon lisättiin 0,125 ml sarjana laimennettua näytettä, joka oli määritettävä lymfotoksiinin
35

suhteen. 18 tunnin kuluttua levyt pestiin ja lymfotoksiinilla indusoitu solujen hajoaminen havaittiin levyihin tarttumisena värjäämällä levyt kristallivioletin 1 %:isella liuoksella, joka oli metanoli:vesi -seoksessa (1:4 tilav./tilav:). Värjäytyksen voimakkuus havaittiin sekä vi-
 5 suaalisesti että spektrofotometrisesti 450 nm:n absorbanssilla että 570 nm:n transmissiolla, käyttämällä Dynatech-spektrofotometriä. Soluille, jotka oli siirrostettu viljelyelatusaineen kanssa yksinään, määrättiin hajoaminen 0 %:ksi,
 10 kun taas ne, joiden kanssa oli 3M guanidiinihydrokloridia, antoivat päätepisteenä 100 %:isen hajoamisen. Yksi lymfotoksiiniyksikkö määritetään määränä, joka tarvitaan, jotta 50 %:a kuhunkin kammioon siirrostetusta 12 000 solusta hajoaa. On huomattava, että muita sytotoksisen aktiivisuuden
 15 määrittämismenetelmiä voidaan myös käyttää. Katso esimerkiksi B. Aggarwal et al., julkaisussa "Thymic Hormones and Lymphokines", 1983, julkaisija A. Goldstein, Spring Symposium on Health Sciences, George Washington Univ. Medical Center (the A549-solulinja, joka luetaan tähän ma-
 20 teriaaliin kuuluvaksi, on saatavissa ATCC:stä CLL185:nä). Solujen hajoamistuotteet eivät ilmaisseet havaittavissa olevaa sytolyyttistä aktiivisuutta yllä kuvatuissa hiiren soluilla suoritetuissa määrityksissä. γ -interferonia ekspressoivista viljelmistä saadut kontrollihajoamistuotteet
 : 25 sisälsivät γ -interferoniaktiivisuutta. Tämä tulos antaa aiheen olettaa, että synteettinen geeni ei koodannut aktiivista lymfotoksiinia. Tälle oli usein mahdollisia selityksiä. Esimerkiksi: (1) E. coli hajotti lymfotoksiinin, (2) lymfotoksiinigeeniä ei transkriboitu E. colissa, (3) lymfotoksiini-viestille ei suoritettu translaatiota E. colissa,
 : 30 (4) proteiinilla ei ollut sopivaa sekvenssiä, mikä johtuu proteiinisekventoinnin virheestä tai (5) 16 tähteen muodostama karboksi-päätteinen sekvenssi tai osa siitä oli itseasiassa välttämätön aktiivisuudelle tai lymfotoksiinimolekyylin sopivalle konfiguraatiolle.
 35

Esimerkki 2Menetelmä lymfotoksiinia koodittavan cDNA:n saamiseksi

RNA eristettiin ihmisen perifeerisen veren lymfosyyt-
 tien ei-adherentista solujakeesta 48 tunnin kuluttua forbo-
 5 limyristaattiasetaatin (10 ng/ml), stafylokokkiperäisen
 enterotoksiini B:n (1 μ g/ml) sekä tymosiini α -1:n kanssa
 suoritettua induktion jälkeen (S. Berger et al., 1979,
 "Biochemistry" 18: 5143 - 5149). Tämä viljelmä valmisti
 400 yksikköä lymfotoksiinin aktiivisuutta/ml supernatanttia.
 10 tia. mRNA konsentroitiin adsorption avulla, joka suoritet-
 tiin liikkumattomaksi tehtyyn oligo-dT:een, eluoitiin ja
 cDNA valmistettiin käänteistranskription avulla P. Gray
 et al., 1982, "Nature" 295: 503 - 508): Käänteistranskrip-
 taasia käytettiin lähetti-RNA:n cDNA-kopion valmistamiseksi
 15 standardi-menetelmin, toinen säie valmistettiin (myös stan-
 dardimenetelmin) Klenow-käsittelyn avulla, ja cDNA:a käsi-
 teltiin S-1-nukleaasilla hiusneulasilmukan poistamiseksi.
 Tämän cDNA:n insertoimiseksi vektoriin, päät sidottiin
 adaptoriin tai yhdistäjään siten, että muodostui 5'- ja
 20 3'-restriktioentsyymikohtia tai, mieluummin, kohesiivisiä
 päätteitä ennalta määritettyä restriktioentsyymikohtaa var-
 ten. Tähän tarkoitukseen käytettiin oligonukleotidi 5'HO-
 AATTCATGCGTTCTTACAG

GTACGCAAGAATGTC-P 5'. Oligonukleotidi liitettiin
 : 25 cDNA:an, cDNA eristettiin uudelleen polyakryyliamidigeeli-
 elektroforeesin avulla. λ gt11:a, joka on julkisesti saata-
 vissa (tai sen kanssa pääpiirteissään ekvivalenttista
 γ gt11:a, joka on saatavissa ATCC:sta) uutettiin EcoRI:lla,
 ja takaisin saatiin lineaarinen fragmentti (M. Wickens
 : 30 et al., 1978, "J. Biol. Chem." 253: 2483 - 2495). Yhdis-
 tetty käänteistranskription tuote ja γ gt10:n hajotuksen
 tuote liitettiin yhteen, ja yhdistämistuotetta käytettiin
 E. coli C-600:n transfektointiin tai muuhun isännän suh-
 teen herkkään γ -faagi-infektointiin. Arviolta noin 10 000
 35 rekombinanttifaagia siirrostettiin 15 cm:n levyille ja
 seulottiin epätäsmällisellä täplähybridisaatiomenetelmällä

(T. Maniatis et al., 1978, "Cell" 15: 687 - 701 sekä P. Gray et al., "PNAS" 80: 5842 - 5846) käyttämällä P:lla merkattua koetinta, joka oli valmistettu kuvion la esittämästä segmentti A:sta J. Taylorin et al.:n menetelmällä, 5 1976, "Biochem. Biophys. Acta" 442: 324 - 330, jossa käytettiin vasikan kateenkorvan DNA-primereita (PL Biochemicals). Kaksinkertaiset niroselluloosasuodattimet hybridisoitiin low stringency-menetelmällä, käyttäen koettimen 5×10^7 iskua minuutissa, 20 %:isessa formamidissa. 10 Suodattimet pestiin kaksi kertaa 0,3 M natriumkloridilla, 0,03 M natriumsitraatissa sekä 0,1 %:isessa natriumdodesyy-lisulfonaatissa (SDS) 37°C:ssa.

Kaksi faagia hybridisoitiin koettimen kanssa ja puhdistettiin täpläpuhdistuksen avulla (plaque purifiield). 15 Puhdistettu faagi hybridisoitiin sekä segmentti A-koettimen kanssa että segmentistä B valmistetun koettimen kanssa. Kahden hybridisoivan faagin, γ LT1 ja γ LT2, cDNA-insertit alakloonattiin M13mp8:aan ja sekventoitiin dideoksi-ketjun päättämismenetelmällä (A. Smith, 1980, "Methods in Enzymo- 20 logy" 65: 560 - 580). LT2:ssa sijaitseva insertti oli vain 600bp, eikä se sisältänyt koko 3'-koodittavaa aluetta lymfotoksiinia varten. γ LT1:ssä sijaitseva insertti sisälsi koko koodittavan alueen leusyyli-amino-päätteiselle lymfotoksiinille sekä 650 bp 3'-transloitumattoman alueen (joka : 25 sisältää polyadenylaation yhtäpitävyyssignaalin) sekä kodonit 18 aminohappoa varten, jotka ovat leusyyli-päätteelle amino-terminaalisia. Koska tämä ei muodosta koko lymfotoksiinia koodittavaa aluetta, valmistettiin 32 P:llä merkattu koetin γ LT1:n cDNA-insertista, ja sitä käytettiin seulomaan : 30 lisäksi tuleva 25 000 rekombinantti γ gt10-faagi suurella tarkkuudella (katso T. Huynh et al., 1984, in Practical Approaches in Biochemistry IRL Press, Oxford). Eristettiin kaksitoista hybridisoivaa faagia, ja pisimmän insertin, joka on γ LT11:sta, sekvenssi on esitetty kuviossa 2a. Pisim- 35 mälle, avoimelle lukuraamille suoritettiin translaatio aloittamalla ensimmäisestä havaitusta ATG:stä. Numerot

kukin rivin yläpuolella tarkoittavat aminohapon asemaa ja numerot kunkin rivin alapuolella tarkoittavat nukleotidin asemaa. Leusyyli-tähde, joka on merkitty "1":ksi, tarkoittaa leusyyli-aminopäätteisen lymfotoksiinin ensimmäistä sekventoitua tähdettä (kuvio 1a), ja se on luultavasti lymfotoksiinin kypsän tyyppin ensimmäinen aminotermi-naalinen tähde. Ensimmäiset 34 tähdettä edustavat signaali-sekvenssiä. Tähteet 156 - 171 eivät olleet määritettävissä lymfotoksiinin proteiinisekventoinnin avulla, mutta sen sijaan ne voitiin lukea nukleotidisekvenssistä.

Esimerkki 3

Synteettinen geeni/luonnonvarainen cDNA-ekspressio-vektorihybridin rakentaminen leusyyli-amino-terminaalista lymfotoksiinia varten

Tämä rakenne on esitetty kuviossa 2b, pLTXB1:a (joka sisälsi inaktiivisen synteettisen geenin) hajotettiin osittain EcoRI:llä ja PstI:llä, ja saatiin takaisin 685 bp-fragmentti, joka sisälsi lymfotoksiinin 125 N-terminaalista tähdettä koodittavan DNA:n. Muodostettiin osittainen PstI-hajotustuote tähteessä 10 sijaitsevan, lisäksi tulevan PstI-kohdan vuoksi (kuvio 1a). 301 bp-fragmentti, joka sisälsi lymfotoksiinin 51 C-terminaalista aminohappoa koodittavan DNA:n, eristettiin hajottamalla γ LT1:n alakloonattu cDNA EcoRI:llä ja PstI:llä (nämä kohdat on esitetty kuviossa 2a nukleotidiasemissa 554 ja 855). Nämä fragmentit eristettiin 5 %:isella polyakryyliamidilla suoritettun elektroforeesin sekä elektroeluution avulla. Fragmentit yhdistettiin pBR322:een, joka oli uutettu EcoRI:llä ja joka oli defosforyloitu bakteeriperäisellä alkalisella fosfataasilla taustatransformanttien vähentämiseksi. Syntyvää ekspressio-plasmidia, pLTtrpl, karakterisoitiin sopivan suuntauksen ja sekvenssin suhteen restriktioendonukleaasi-hajotuksen ja DNA-sekventoinnin avulla. Leusyyli-amino-päätteinen lymfotoksiini ekspressoitiin transformoimalla E. coli 31446 pLTtrpl:llä ja viljelemällä transformantteja elatus-

aineessa, joka sisälsi tetrasykliiniä, 37°C:ssa, 4 - 6 tunnin ajan, kunnes saavutettiin optinen tiheys, 1,0. Solujen hajoamistuotteet sisälsivät sytotoksista aktiivisuutta. Ekspressoidun lymfotoksiinityypin leusyyliamino-

5 päätteen havaittiin olevan suljetun metionyyli-tähteen substituoima. Tämän synteessin tuotteen uskotaan olevan formyyli-metionyyli- pikemmin kuin metionyyli-tyyppiä.

Esimerkki 4

Lymfotoksiinin immunoaffiniteettipuhdistus

10 Anti-lymfotoksiinia erittävä hiiren monoklonaalinen solulinja (esimerkki 8) kasvatettiin hiiressä ja puhdistettiin ascites-nesteestä ioninvaihtokromatografian avulla. Anioninvaihtoeluaatti kytkettiin syanogeenibromidilla aktivoituun Sepharoseen[®], konsentraationa 2 mg/ml hartsia.

15 Pylväs, jonka tilavuus oli 20 ml, tasapainotettiin peräkkäin TBS:llä (joka sisälsi 0,05 M Tris-HCl:a, pH 7,0, 0,15 M natriumkloridia sekä 2 mM EDTA:a); sitten eluutiopuskurilla (joka sisälsi 0,1 M etikkahappoa; pH 4,5, 150 mM natriumkloridia); sekä lopuksi TBS:llä. pLTtrpl:llä

20 transformoiduista, äänen avulla rikotuista E. colin soluista, 40 %:isella ammoniumsulfaattikyllästyksellä saatu saostuma (aiemmin kirkastettu sentrifugoimalla) lietettiin 0,1 M Tris-HCL:ään, pH 7,4, ja 5 mM EDTA:aan sekä panostettiin pylvääseen, nopeudella yhden pylvään tilavuus tunnissa.

25 TBS:llä, joka sisälsi 0,05 % Tween 20:a, suoritettun perusteellisen pesun jälkeen, spesifisesti sidottu materiaali eluointiin eluutiopuskurilla, jonka pH välittömästi säädettiin 7,8:ksi 0,1 tilavuudella 1 M Tris-HCl:a, pH 8,5, ja varastoitiin 4°C:ssa. Tämän puhdistetun lymfotoksiinin spesifinen aktiivisuus oli $2-10 \times 10^7$ yksikköä/mg,

30 yllä esitetyllä hiiren L-929-menetelmällä määritettynä.

Eluaatti sisälsi suurimman osan pylvääseen panostetusta aktiivisuudesta. Pääosa eluaatin kokonaisproteiinista vaelsi yksinkertaisena nauhana sekä pelkistävässä

35 että ei pelkistävässä olosuhteissa, SDS-polyakryyliamidi-

geelielektroforeesissa. Tämän vyöhykkeen liikkuvuus vastaa molekyylipainoa noin 18 000, joka on sopusoinnussa glykolysoimattoman, leusyyli-amino-päätteisen lymfotoksiinin ennustetun molekyylipainon arvon, 18 664, kanssa, joka perustuu pääteltyyn aminohapposekvenssiin. Sen biologisen aktiivisuuden edelleen karakterisoimiseksi, puhdistettu lymfotoksiini tutkittiin sytolyyttisen aktiivisuuden suhteen in vitro sekä kasvaimen vastaisen aktiivisuuden suhteen in vivo.

10 Esimerkki 5

Rekombinanttilymfotoksiinin biologinen aktiivisuus
in vivo

 Rekombinantti- sekä lymfoblasteista peräisin oleva lymfotoksiini tutkittiin in vivo kasvainkuoliomäärityksen avulla. MethA(a)- sarkoomia kasvatettiin 7 - 10 päivän ajan herkissä hiirissä [BALB/C x C57Bl/6f1 tai CB6f1], ja kasvaimiin injektointiin sitten välittömästi esimerkin 4 mukaista lymfotoksiinia, lymfoblastilymfotoksiinia (valmistettu ja puhdistettu yllä kuvatulla tavalla) tai kontrollinäytteitä. 20 - 24 tunnin kuluttua hiiret tapettiin, kasvaimet poistettiin ja arvioitiin histologisesti nekroosin laajuuden suhteen. Kuten taulukossa 1 on esitetty sekä rekombinantti- että lymfoblastilymfotoksiini aiheuttivat MethA(a)-sarcoman huomattavan nekroosin in vivo. Kontrollinäytteet eivät indusoineet MethA(a)-sarkoomien nekroosia.

Taulukko 1

Rekombinantti- ja luonnonvaraisella lymfotoksiinilla aikaansaatu MethA(a):n nekroosi

5	Käsittely	Hiirien lukumäärä			
		Särcoma-kuolion arviointi			
		+++	++	+	-
	Puskuri 1 kontrolli	-	-	-	3
	Lymfoblastilymfotoksiini,				
	25 000 yksikköä	4	-	-	-
10	Lymfoblastilymfotoksiini,				
	10 000 yksikköä	4	-	-	-
	Rekombinanttilymfotoksiini				
	200 000 yksikköä	14	2	2	-
	Rekombinanttilymfotok-				
15	siini, 25 000 yksikköä	3	-	-	1
	Rekombinanttilymfotok-				
	siini, 10 000 yksikköä	3	-	1	-
	Puskuri 2 kontrolli	-	-	-	9

20 Lymfoblastilymfotoksiini ruiskutettiin puskuriin 1 liuotettuna (0,01 M Tris-HCl, 0,05 M $(\text{NH}_4)_2\text{HCO}_3$, pH 8,0) ja rekombinanttilymfotoksiini ruiskutettiin puskuriin 2 liuotettuna (0,15 M NaCl, 0,1 M natriumasetaatti ja 0,1 M Tris-HCl, pH 7,8).

25 Hiilihydraatin puuttuminen rekombinanttilymfotoksiinista ei näytä vaikuttavan biologiseen aktiivisuuteen, koska rekombinanttilymfotoksiinin valmistaman lymfotoksiinin aktiivisuus $2 - 10 \times 10^7$ yksikköä/mg) on suunnilleen sama kuin lymfoblastilymfotoksiinille ilmoitettu aktiivisuus (4×10^7 yksikköä/mg).

30 Rekombinanttilymfotoksiinin aktiivisuus ilmaisi myös lämpölabiilitettä, samankaltaista kuin luonnonvaraisella lymfotoksiinilla, esim. inaktivoitumista vesiliuoksessa, 80°C :ssa yhden tunnin ajan suoritettuna kuumennuksen jälkeen.

Esimerkki 6Ekspressiovektori metionyyli-histidyyli-amino-
päätteisen lymfotoksiinin konstruoimiseksi

Rakenne plasmidille, joka ohjaa E. colissa metio-
nyyli-histidyyli-aminoterminalisen lymfotoksiinin eks-
pressiota, on esitetty kuviossa 3. Synteettinen oligo-
nukleotidi insertoituiin ekspressioplasmidiin siten, että
se koodittaa metioniini-aloituskodonia, joka on histidyy-
li-amino-päätteisen lymfotoksiinin histidyyli-kodonin
vieressä (tähde 24 kuviossa 2a). Tämä suoritettiin eristä-
mällä 4630bp-vektorifragmentti pLTtrpl:stä XbaI- ja ClaI-
uuton avulla, preparatiivisella 1 %:isella agarosegeeli-
elektroforeesilla sekä elektroeluution avulla. Samalla
tavalla eristettiin pLTtrpl:stä 570 bp BamHI-ClaI-frag-
mentti, joka sisälsi suurimman osan lymfotoksiinia koodit-
tavasta sekvenssistä. Aiemmin esitetyin menetelmin synte-
tisoitiin kaksi synteettistä oligonukleotidiä, ja ne se-
koitettiin kuvion 1a mukaisten oligonukleotidien 6, 7,
52 ja 53 kanssa. Noin 50 pikomoolia kutakin oligonukleo-
tidiä käsiteltiin polynukleotidikinaasilla, esimerkissä
1 kuvatulla tavalla. Oligonukleotidejä käsiteltiin läm-
mön avulla (annealed), ja sitten ne sidottiin seoksen
kanssa, jossa oli 570 bp BamHI-ClaI-fragmentti sekä 4630
bp XbaI-ClaI-vektorifragmentti. Sidosseos transformoitiin
E. coli ATCC 31446:een, ja rekombinantit valittiin tetra-
sykliiniresistenssin perusteella. Plasmidi p20KLT saatiin
takaisin eräästä transformantista. Plasmidi p20KLT karak-
terisoitiin restriktioentsyymien ja DNA-sekvenssianalyysin
avulla.

Esimerkki 7Sytotoksisen lymfotoksiinifuusiomuunnoksen valmis-
taminen

Plasmidi, joka sisältää DNA:a, joka koodittaa
lymfotoksiinin yhdistelmää bakteeriperäisen proteiinin
kanssa, konstruoitiin kloonamalla sekvenssi, joka koo-
dittaa bakteeriperäistä signaalisekvenssiä, joka sijait-

see lymfotoksiinin rakennegeenin vieressä. Geenin sekvenssi *E. coli*in lämpöstabiliia enterotoksiinia II (STII) varten on karakterisoitu (R.N. Picken et al., 1983, "Infection and Immunity" 42: 269 - 275), ja se koodittaa 23 aminohapposignaalisekvenssiä, joka suuntaa STII:n erittymisen *E. coli*in periplasmiseen tilaan.

Plasmidi pWM501 (Picken et al., 1983, "Infection and Immunity" 42 /17: 269 - 275) sisältää lämpöstabiliin enterotoksiini (STII)-geenin. Osa DNA:sta, joka koodittaa STII-geeniä, saatiin takaisin pWM501:stä käyttämällä seuraavia vaiheita. pWM501 hajotettiin *RsaI*:llä, ja 550 bp DNA-fragmentti eristettiin. Tämä geenifragmentti sidottiin faagi M13mp8:aan (J. Messing et al., julkaisussa in the Third Cleveland Symposium on Macromolecules: Recombinant DNA, julk. A. Walton, Elsevier, Amsterdam /1981/ ss. 143 - 153), joka oli aiemmin hajotettu *SmaI*:lla. Sidottua DNA:a käytettiin transformoimaan *E. coli* JM101, joka on kaupallisesti saatavissa oleva kanta M13-faagin kanssa suoritettavaa käyttöä varten. Tulokseksi saatiin selvien täplien muodostuminen. Kaksisäikeinen M13mp8 STII *Rsa*-johdannainen eristettiin *E. coli* JM101:stä, joka oli infektoitu täällä faagilla standardimenetelmiä käyttäen (J. Messing et al. lainattu teoksessa). Käyttämällä juuri kuvattua M13mp8 alakloonausmenetelmää faagin käyttöön antamat, erilaisten restriktioendonukleaasien sarjat sitovat noin 550 emäsparifragmentin, joka sisältää STII-johdantogeenin. M13mp8 STII *RSA*-johdannainen hajotetaan sitten *EcoRI*:llä ja *PstI*:llä ja eristetään DNA-fragmentti, joka on vähän suurempi kuin 550 bp DNA-fragmentti.

EcoRI-*PstI*-fragmentti alakloonattiin pBR322:een. Tämä suoritettiin hajottamalla pBR322 *EcoRI*:llä ja *PstI*:llä sekä eristämällä vektori. Eristetty vektori sidottiin *EcoRI*-*PstI* DNA-fragmenttiin. Tätä DNA:a käytettiin *E. coli* ATCC 31446:n transformaatioon, ja valittiin tetrasykliinille resistentit pesäkkeet. Plasmidi eristettiin resistentistä *E. coli*in pesäkkeestä ja se nimitettiin pSTII-osaksi.

pSTII-osa hajotettiin MnlI:llä ja BamHI:llä, ja eristettiin 180 bp fragmentti, joka sisältää STII Shine-Dalgarno-sekvenssin, STII-signaalisekvenssi sekä kypsän STII-geenin 30 ensimmäistä kodonia. 180 bp DNA-fragmentti sidottiin plasmidiin, joka sisältää trp-promoottorin. Yhtä sellaista plasmidia, pGH207-1, on kuvattu aiemmin (H. de Boer et al., 1982, julkaisussa Promoters: Structure and Function, julkaisijat R. Rodreguez et al. Chamberlin, Praeger jul. New York, NY, ss. 462 - 481). Tässä esimerkissä käytettiin tämän plasmidin johdannaista, pGH207-1*, jossa EcoRI kohta 5' trp-promoottoriin nähden oli muutettu EcoRI*:ksi täydentämällä DNA-polymeraasi I:llä (DNA pol I) ja yhdistämällä tasapäiset päät sidonnan avulla. trp-promoottorin sisältämä plasmidi hajotettiin DNA pol I:llä ja kaikilla neljällä dNTP:llä esiin pullistuvan sekvenssin täydentämiseksi. Sitten DNA-valmiste hajotettiin BamHI:llä ja vektorin sisältävä fragmentti eristettiin. Sitten tämä vektorifragmentti sidottiin 180 bp STII signaalin sisältävään DNA-fragmenttiin, joka oli edellä eristetty. Sidontaseos käytettiin E. coli ATCC 31446:n transformaatioon ampisilliiniresistenssin aikaansaamiseksi. STII-johdannoksi nimitetty plasmidi eristettiin ampisilliinille resisten-

5
10
15
20

tistä peräkkeestä.

STII:ä koodittavia sekvenssejä sisältävä M13 faagi konstruointiin ensin sitomalla pSTII-johdannon 180bp XbaI-BamHI fragmentti XbaI:een ja BamHI:een, joita oli uutettu M13mpl0:lla. Syntyvää faagi DNA:a, pSTII-sukkulaa (pSTII-shuttle) karakterisoitiin restriktioendonukleasaanalyysin avulla sekä nukleotidisekventoinilla. Sitten tähän vektoriin liitettiin LT:a koodittavat sekvenssit sitomalla pLTtrpl:n HpaI-EcoRI 700 bp fragmentti Sma-EcoRI-kohdasta hajotettuun pSTII-sukkulan replikoituvan muotoiseen (RF, kaksisäikeinen) DNA:aan; SmaI ja HpaI kohdat ovat molemmat tasapäisiä ja yhteensidottuja (mikä johtaa molempien kohtien häviämiseen). Syntyvä faagi DNA, M13-STII-LT, karakterisoi-

25
30
35

(primer) 5'p CAAATGCCTATGCACTGCCAGGCGTAGG käsiteltiin kinaasilla ja sekoitettiin templaatin (M13-STII-LT) kanssa ligaasipuskurin ja XbaI-EcoRI-kohdasta hajotetun M13mpl0 RF DNA:n läsnäollessa (DNA:n valmistuksen edistämiseksi

5 J.P. Adelman et al.:n kuvaamalla tavalla, 1983, "DNA" 2: 183 - 193); seosta kuumennettiin 95°C:een, ja sitten sen annettiin jäähtyä hitaasti huoneenlämpötilassa 30 minuutin ajan, ja sitten se pantiin jäiden päälle 30 minuutiksi. Kaikki neljä deoksinukleotiditrifosfaattia lisättiin sitten

10 yhdessä ATP:n, T4 DNA-ligaasin ja E. coli DNA polymeraasi I:n suuren fragmentin (Klenow) kanssa. Seosta inkuboitiin yhden tunnin ajan 14°C:ssa, ja sitten se käytettiin transfektoimaan vaadittu E. coli JM101, joka on kaupallisesti saatavissa oleva kanta, tai jokin muu M13 faagin isäntä.

15 Oikein mutantoitu faagi identifioitiin hybridisaatioseulonnan avulla käyttämällä koettimena ³²p-radiomerkattua primeria. Syntyvä faagi ST-LT-mut karakterisoitiin DNA-sekvenssi-analyysin avulla. DNA:n replikoituva muoto valmistettiin tästä faagista, ja sitä käytettiin 761 bp XbaI-

20 EcoRI-fragmentin eristämiseen, joka sisälsi DNA:n, leusyyli-amino-päätteisen lymfotoksiinin koodittavan sekvenssin vieressä sijaitsevaa STII-signaalisekvenssiä varten. Tämä DNA sidottiin XbaI-BamHI:llä hajotetun p20KLT:n (suuri 4285 bp vektorifragmentti) sekä pBR322:n 375 bp

25 EcoRI-BamHI-fragmentin kanssa. Syntyvää plasmidia, pSTL8LT, karakterisoitiin restriktiokartoituksen ja DNA-sekventoinnin avulla. Valmistettiin samanlainen rakenne, joka kooditti STII-signaalin amino-pään liittymisen histidyyli-amino-päätteisen lymfotoksiinin histidiini-tähteeseen.

30 Muodostuvat plasmidit pSTLT18 ja pSTLT16. Restriktioentsyymianalyysiä ja dideoksisekventointia käyttäen niiden varmistettiin koodittavan STII-fuusiota. E. coli, joka oli transformoitu plasmideilla pSTL18 tai pSTLT16, syntetisoi STII-signaalisekvenssi-fuusiota leusyyli-amino-terminaalisen ja histidyyli-amino-terminaalisen lymfotoksiinin kanssa,

35

mikä geelielektroforeesin avulla määritettiin yhtäpitäväksi lasketun molekyylipainon kanssa. E. colin solujen hajoamistuotteilla, jotka sisälsivät näitä fuusioproteiineja, oli sytolyyttistä aktiivisuutta.

5

Esimerkki 8Hiiren monoklonaalisen vasta-aineen valmistusmenetelmä

Puhdistettu lymfoblasti lymfotoksiini, joka saatiin esimerkissä 1, dialysoitiin fosfaattipuskurikeittosuolaa (PBS) vasten. Dialyssaatti sisälsi 200 μ g lymfotoksiinia millilitrassa. Dialyssaattiin lisättiin glutaraldehydiä konsentraatioksi 70 mM glutaraldehydiä, seosta inkuboitiin 2 tunnin ajan huoneenlämpötilassa, glutaraldehydiä lisättiin, jotta sen kokonaiskonsentraatioksi tuli 140 mM, inkubointia jatkettiin vielä 6 tunnin ajan, ja sitten seos dialysoitiin PBS:a vastaan. 50 μ g:n avulla ristikytettyä lymfotoksiinia (tässä yhteydessä myöhemmin, "polylymfotoksiini") sekä 0,5 ml Freundin adjuvanttia ruiskutettiin hiireen (kanta BALB/c) ihonalaisesti. Yhden viikon kuluttua hiiri boosterimmunisoitiin 50 μ g:lla polylymfotoksiinia sekä 0,5 ml:lla Freundin epätäydellistä adjuvanttia, puoleksi lihaksensisäisesti ja puoleksi vatsaonteloon. Seerumi koottiin 7 päivän kuluttua ja määritettiin anti-lymfotoksiiniaktiivisuuden suhteen ELISA-määrittelyksen avulla.

25

ELISA-määrittely suoritettiin seuraavasti: Puhdistetun lymfotoksiinin puskuroitu liuos pantiin mikrotiitterikammioihin ja kunkin kammion annettiin peittyä noin 100 ng:lla lymfotoksiinia. Adsorboitumaton lymfotoksiiniliuos imettiin pois kammioista. 50 μ l sopivasti laimennettua koenäytettä yhdistettiin 100 μ l:n kanssa PBS:a, joka sisälsi 5 mg/ml härän seerumin albumiinia (PBS-BSA-puskuri) ja lisättiin kuhunkin kammioon, inkuboitiin kahden tunnin ajan huoneenlämpötilassa, pestiin PBS:llä, joka sisälsi 0,05 % Tween 20, 100 μ l piparjuuriperoksidaasilla merkattua vuohen anti-hiiri-IgG:a PBS-BSA-puskurissa li-

35

sättiin kuhunkin kammioon ja inkuboitiin yhden tunnin ajan. Kukin kammio pestiin PBS:llä, joka sisälsi 0,05 % Tween 20:a sekä sitraattifosfaattipuskuria, pH 5, joka sisälsi 0,1 mg 0-fenyleenidiamiinia/ml (substraattiliuos), ja
 5 H_2O_2 :n 30 %:ista vesiliuosta (suhteessa 4 μ l 30 %:ista tilav./tilav. H_2O_2 :a 10 ml:ssa substraattiliuosta) lisättiin kuhunkin kammioon. Kammiota inkuboitiin 30 minuutin ajan, reaktio pysäytettiin 50 μ l:llä 2,5 M rikkihappoa, adsorbanssi mitattiin 492 nm:ssä. Kammiot, joiden adsor-
 10 banssi oli suurempi kuin 1 O.D., katsottiin anti-lymfotoksiini-positiivisiksi.

Koenäytteet määritettiin myös kyvyn suhteen neutraloida lymfotoksiinin sytolyyttinen aktiivisuus hiiri L929:llä suoritettussa kokeessa. Seerumi koottiin immuni-
 15 soiduista eläimistä, tai hybridomasupernatantit liuotettiin tarvittavaan RPMI-1640-elatusaineeseen, joka sisälsi 10 % härän sikiön seerumia ja noin 100 yksikköä lymfotoksiinia millilitrassa, ja siveltiin mikrotiitterikammioihin, jotka sisälsivät viljeltyjä L929-soluja, samalla tavalla
 20 kuin tavanomaisessa sytolyysimäärityksessä. Kontrollissa kaikki solut hajosivat. Neutraloiva vasta-aine havaittiin lymfotoksiinin epäonnistumisena hajottaa L929-soluja.

Glutaraldehydillä polymeroidulla lymfotoksiinilla immunisoidut eläimet muodostivat vasta-aineita, jotka oli-
 25 vat aktiivisia ELISA-määritysmenetyksessä, mutta mitään seerumia neutraloivaa aktiivisuutta ei havaittu.

Valmistettiin suspensio, joka sisälsi 100 μ g lymfotoksiinia ja 1 ml:n 1,64 paino-%:ista/tilavuus aluminiumhydroksidi $[Al(OH)_3]$ suspensiota ja käytettiin saman hiiren immunisointiin. Hiiri ruiskutettiin lihaksensisäisesti
 30 100 μ l:lla ja vatsaontelonsisäisesti 400 μ l:lla samaa suspensiota. Yhden viikon kuluttua hiireen ruiskutettiin laskimonsisäisesti 10 μ g polymeroimatonta ja adsorboimatonta lymfoblastilymfotoksiinia, joka oli 100 μ l:ssä PBS:a.
 35 Koe, joka suoritettiin kolme päivää myöhemmin 1/80 laimen-

nuksella eläimen seerumia, ilmaisi lymfotoksiinia neutraloivan vasta-aineen läsnäolon.

Tästä eläimestä poistettiin perna. 3×10^7 perna-solua fuusioitiin 5×10^7 hiiren myelomasolun kanssa ja siirrostettiin mitrotiitterikammioihin, jotka sisälsivät HAT-elatusainetta ja noin 3 000 vatsakalvosta peräisin olevan makrofaagin kanssa/mikrotiitterikammio, S. Fazekas De St. Grothin menetelmän mukaisesti, 1980, "J. Immunol. Meth." 35: 1 - 21. Hybridomia, kammioista, jotka sisälsivät supernatantteja, jotka olivat positiivisia yllä esitetyssä ELISA-määrittämismenetelmässä, jotka oli kasvatettu 1 ml:n tilavuudessa DMEM-elatusainetta, jossa oli 20 % vasikansikiönseerumia, 10 % NCTC-135-elatusainetta, 5×10^{-5} M beeta-merkaptopetanololia sekä HAT:a, levitettiin mikrotiitterikammioihin, statistisesti keskimäärin yksi solu kammiota kohti, ja sitten niitä viljeltiin 1 tai 5 ml:n tilavuudessa samaa elatusainetta. Sen jälkeen supernatantit määritettiin neutraloivan vasta-aineen suhteen. ELISA-määrittämismenetelmässä, positiivisista hybridomasoluista, jotka oli saatu aluminiumhydroksidi-immunisaatiosta, statistisesti noin 2 % syntetisoi neutraloivaa vastaainetta. Tästä hybridomasolujen ryhmästä valittiin lymfotoksiinivasta-aine, jolla oli valinnaisesti korkea affiniteetti.

25

Esimerkki 9

Mutaatiokohdan suhteen spesifinen lymfotoksiinin mutaatio

30

Esimerkin 3 mukaista menetelmää noudatettiin tarkasti tässä esimerkissä, paitsi että synteettisen oligonukleotidin segmenttiä 6 modifioitiin siten, että se sai sekvenssin 5'CTCAACTCTGCACCCA3' ja sen komplementaarinen säie (segmentti 53) muunnettiin siten, että sen sekvenssiksi tuli 3'AGACGTGGGTCGTCGT5'.

35

Modifioidut oligonukleotidit käsiteltiin lämmön avulla (annealed) jäljelle jääviksi oligonukleotideiksi ja sidottiin ekspressiovektoriin esimerkissä 6 kuvatulla

tavalla. Tämä vektori sisältää 2 bp substituution, joka muutti lyysiini +28-kodonin lyysiinistä histidiiniksi. Histidiinimutantti ekspressoidaan E. colin ATCC 31446 transformaatiossa.

- 5 Muita sijainnin suhteen määrättyjä mutantteja valmistettiin samalla tavalla, mieluummin valikoimalla koodonit, niin, ettei lisätty EcoRI-restriktiokohtaa, joka edellyttäisi osittaista EcoRI-restriktiohajotusta pLTXB1:n hajottamisessa, jota kaivattiin esimerkissä 3. Mutaatioiden
10 ei tulisi lisätä myöskään uusia XbaI- tai BamHI-kohtia fragmenttiin B tai HindIII- tai BglII-kohtia fragmenttiin C. Osittaiset hajottamiset edellyttävät muuten sopivasti asennettavaa pLTXB1-mutanttia; täydellinen hajottaminen tuottaisi poistomutantin pikemmin kuin substituutiomutantti,
15 joka on kohteena tässä tapauksessa.

Esimerkki 10

Hiiren ja härän lymfotoksiinia koodittavan geenin DNA:n identifiointi; hiiren ja härän lymfotoksiinin aminohapposekvenssi

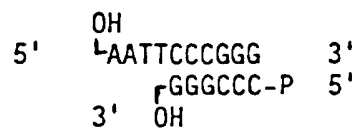
- 20 Hiiren ja härän lymfotoksiinigeenit eristettiin geeni- λ -kirjastoista. Humaanilymfotoksiini cDNA-fragmentti (PvuII-EcoRI, 600bp) radiomerkattiin 32 P-nick-translaation avulla, ja käytettiin koettimena hiiren geeni-DNA- λ -kirjaston (M600-kannan geeni-DNA λ Charon4A:ssa, T. Maniatis
25 et al., Molecular Cloning, s. 31, 1982) ja, itsenäisesti, härän geeni-DNA-kirjaston (EP 88622A) seulomiseksi. Hybridisaatio suoritettiin alhaisella täsmällisyydellä 20 %:isessa formamidissa (Gray and Goeddel "P.N.A.S. USA" 80: 5842-5846 [1983]), ja suodattimet pestiin kaksi kertaa
30 0,3M natriumkloridin vesiliuoksessa, 0,03M natriumsitraatissa ja 0,1 %:isessa SDS:ssä. Useille faageille, jotka oli hybridisoitu humaanilymfotoksiinikoettimen kanssa, suoritettiin plakki-puhdistus (T. Maniatis et al., "Cell" 15: 687 - 701 [1978]), hajotettiin restriktioendonukleaasilla ja analysoitiin Southern-hybridisaation avulla. Hiiren
35

DNA:n 3500 bp EcoRI-fragmentti ja härän DNA:n 2200bp EcoRI-fragmentti hybridisoitiin humaanilymfotoksiinikoet-
timen kanssa. Nämä DNA-fragmentit alakloonattiin plasmidiin pBR322, ja sitten ne sekventoitiin dideoksi-ketju-
5 päättämismenetelmällä (A.J.H. Smith Methods in Enzymology 65: 560 - 580 [1980]). Kuviossa 4 on esitetty hiiren ja härän lymfotoksiinin päätelty proteiinisekvenssi humaanilymfotoksiiniin verrattuina.

Esimerkki 11

10 ADH-promoottorin säätelyn alainen lymfotoksiinin ekspressio hiivassa

Plasmidi pLTrpl hajotetaan XbaI:llä plasmidin avaamiseksi XbaI-kohdasta, juuri proksimaalisesti lymfotoksiinin aloituskodonin nähden. XbaI kohesiiviset päät tehdään
15 tasapäisiksi E. coli DNA-polymeraasiI:n Klenow-fragmentilla neljän dNTP:n kanssa. EcoRI-adaptori



20 kytketään tasapäiseen plasmidifragmenttiin, esiin pistävät 5'-hydroksyyli-päätteet fosforyloidaan käyttämällä polynukleotidikinaasia, sidontaseosta käytetään transformoimaan E. coli ATCC 31446, ja restriktioanalyysin avulla identifioidaan plasmidi pLTtrplRl, joka sisältää ylimääräisen
25 EcoRI-kohdan proksimaalisesti lymfotoksiinin aloituskodonin nähden. Plasmidi pLTtrplRl eristetään, hajotetaan EcoRI:llä ja takaisin saadaan lymfotoksiini-DNA:a sisältävä fragmentti SP.

30 Plasmidi pFRPn (EP 60 057A) hajotetaan EcoRI:llä, käsitellään alkalisella fosfataasilla renkaan uudelleenmuodostumisen estämiseksi, sidotaan SP-lymfotoksiini-fragmenttiin T4 DNA-ligaasia käyttäen, ja sitten sidontaseos käytetään E. coli ATCC 31446:n transformointiin. Ampisiliinille resistentit pesäkkeet tuottavat kaksi plasmidien
35 sarjaa, joissa on SP-insertti vastakkaisesti suuntautuneena

kuin oli määritetty restriktioanalyysin avulla agarosei-
elektroforeesigeeleillä. Plasmidit puhdistetaan E. coli-
transformanteista, ja niitä käytetään transformoimaan hii-
va, jolla on trp1-mutaatio (esimerkiksi hiivakanta RH218,
5 rajoittamaton ATCC säilytysnumero 44076) trp⁺-fenotyyppiksi.
Löydetään plasmidit, jotka ovat orientoituneet siten, että
segmentin SP aloituskodoni sijaitsee alkoholidehydroge-
naasi-promoottorifragmentin vieressä, ja niitä käytetään
hiivan transformoimiseksi lymfotoksiiniekspressiota varten.
10 Lymfotoksiini saadaan takaisin hiivatransformanttien uut-
teista. Plasmidien stabilisuutta suuressa mittakaavassa
suoritettavissa fermentaatioissa voidaan parantaa käyttä-
mällä ekspressioplasmidia, joka sisältää 2 mikronin rep-
likaation alun pFRPn-kromosomaalisen replikaation alun
15 (ars 1) sijasta ja joka sopii yhteen isäntäkannan kanssa
(J. Beggs, 1978, "Nature" 275: 104 - 109).

Esimerkki 12

Lymfotoksiinin ekspressio nisäkässoluissa

λLT11 (esimerkki 2) hajotetaan EcoRI:n kanssa, ja
20 takaisin saadaan lymfotoksiinia sisältävä DNA-fragmentti
(käänteistranskription tuote). Plasmidi pEHER (EP 117 060A)
hajotetaan EcoRI:llä, käsitellään vasikansuoliston alkali-
sella fosfataasilla ja liitetään λLT11:n käänteistranskrip-
tiotuotteeseen, joka on EcoRI:n kytkemä. Syntyvät plasmidit
kasvatetaan E. coli ATCC 31446:lla (EP 117 060A), ja ne
25 merkitään pEHERLT I:ksi ja pEHERLT II:ksi. Ne sisälsivät
lymfotoksiini-DNA:n vastakkaisessa suuntauksessa kuin oli
määritetty polyakryyliamidigeeleillä suoritettun restriktio-
analyysin perusteella. Näitä plasmideja käytetään transfek-
toimaan sekä valitsemaan CHO DHFR-DUX-B11-, CHO 1- ja
30 Ltk⁻-soluja.

Kudosviljelmäsolut transfektoidaan sekoittamalla
1 µg pEHERLT I:ä tai pEHERLT II:a, jotka edellä oli val-
mistettu, 10 µg:n kanssa rotan kantaja-DNA:a, 250 µl:n
35 tilavuudessa 0,25 M CaCl₂:a, minkä jälkeen lisättiin pisa-

roittain 250 μ l HEPES-puskuroitua keittosuolaliuosta (280 mM NaCl, 1,5 mM Na_2PO_4 , 50 mM HEPES, pH 7,1). 30 minuutin kuluttua huoneenlämpötilassa, liuos lisätään kudosis-
5 viljelmämaljoissa. Käytetään CHO 1-, CHO DHFR-DUX-B11- sekä Ltk⁻-soluja. Maljat sisältävät 3 ml isäntäsolulle sopivaa elatusainetta.

CHO 1- ja CHO DHFR-DUX-B11-soluille soveltuva elatus-
aine on Ham F-12 elatusaine (Gibco), jota on täydennetty
10 10 %:isella vasikanseerumilla, 100 μ g/ml penisilliiniä,
100 μ g/ml streptomysiiniä sekä 2 μ M:lla L-glutamiinia.
Ltk⁻-solulinjalle sopiva elatusaine on Dulbeccon modifioima
Eaglen elatusaine (DMEM), jota on täydennetty yllä kuvatulla
tavalla.

15 3 - 16 tunnin kuluttua elatusaine poistetaan ja
soluja pestään 20 %:isella glyserolilla, joka on valmistettu
fosfaatilla puskuroituun keittosuolaan. Tuoretta elatusai-
netta lisätään kullekin levyille, ja levyjä inkuboidaan vie-
lä 2 päivän ajan.

20 Transfektioitujen solujen valinta suoritetaan käsit-
telemällä soluja trypsiinillä 2 vuorokauden mittaisen kas-
vatuksen jälkeen (mihin kuuluu solujen käsittely
0,5 mg/ml steriiliä trypsiiniä, joka sisältää
0,2 mg/ml EDTA:a) ja lisäämällä noin 3×10^5 solua 10 mm:n
25 kudosisviljelmälevyille selektiivisen elatusaineen kanssa.
dhfr⁻-soluja varten elatusaine on formulaatio elatusainees-
ta (F-12 GIBCO), josta puuttuu glysiini, hypoksantiini ja
tymiini (GHT⁻-elatusaine): DHFR⁺-soluja varten normaaliin
elatusaineeseen lisätään metotreksaattia (100 - 1000 mM).
30 Kontrollit ajetaan käyttämällä transfektio-olosuhteita,
joissa ei ole plasmidia läsnä sekä plasmidin pFD-11 kanssa
(EP 117 060A), joka sisältää normaalin DHFR:n. Pesäkkeet,
jotka ovat peräisin soluista, jotka poimitaan ja ekspres-
soivat DHFR-plasmidia, ovat näkyvissä 1 - 2 viikon sisällä.
35 Kypsää lymfotoksiinia ekspressoivat transformantit identi-
fioidaan.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä lymfotoksiinin valmistamiseksi, jolla lymfotoksiinilla on kuviossa 2a esitetty aminohapposekvenssi, sen variantin tai fragmentin valmistamiseksi, jolla variantilla tai fragmentilla on kuviossa 2a esitetyn proteiinin biologinen aktiivisuus, tai niiden fuusiotuotteiden valmistamiseksi, jotka lymfotoksiiniaktiivisuuden omaavan proteiinin lisäksi sisältävät bakteeriproteiinia; yhdistelmä-DNA-tekniikalla, t u n n e t t u siitä, että

a) valmistetaan lymfotoksiinia koodaava nukleiinihappo;

b) konstruoidaan vektori lymfotoksiinin ekspressiota varten liittämällä toiminnallisesti vaiheen a) nukleinihappo vektoriin, joka sisältää transkriptionaalisen promoottorisekvenssin ja lymfotoksiinia koodaavan nukleiinihapon transkription ja translaation lopetuksen säätelysekvenssit;

c) transformoidaan bakteeri-isäntä vaiheen b) vektorilla;

d) viljellään vaiheen c) isäntäsolua;

e) annetaan lymfotoksiinin akkumuloitua viljelmään; ja

f) otetaan lymfotoksiini talteen viljelmästä, valinnaisesti käyttäen vasta-ainetta, joka neutraloi lymfotoksiinin sytolyyttisen aktiivisuuden ja jossa ei ole ei-neutraloivia vasta-aineita.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että nukleinihappo koodaa ihmisen prelymfotoksiinia ja lymfotoksiini, joka on vaihtelevasti glykosyloitu, otetaan talteen soluviljelmästä.

3. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että ryhmät -34 - -1 on poistettu lymfotoksiinivariantista ja että se lisäksi sisältää ainakin yhden aminohapon insertin.

4. Patenttivaatimuksen 3 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että insertti on polypeptidin fuu-
sio lymfotoksiinin karboksyylipäättteen kanssa.

5. Patenttivaatimuksen 4 mukainen menetelmä,
5 t u n n e t t u siitä, että polypeptidi liitetään lymfo-
toksiiniin proteolyyttisen entsyymin hydrolyysikohdan
kautta.

6. Patenttivaatimuksen 5 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kohta käsittää lys-lys:n tai
10 lys-arg:n.

7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että kuvion 2a ryhmät -34 - -1 on
korvattu metionyyllillä tai formyylymetionyyllillä.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
15 t u n n e t t u siitä, että ryhmät -34 - +22 on korvattu
metionyyllillä tai formyylymetionyyllillä.

9. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että lymfotoksiinivariantti käsit-
tää asemassa +28 olevan lysiinin korvaamisen histidiinil-
20 lä.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että lymfotoksiinivariantissa sub-
stituutio, deletio tai insertio sijaitsee alueella, joka
leusyyli+1:stä laskettuna käsittää noin 30 ryhmää.

11. Nukleiinihappo, t u n n e t t u siitä, että
25 se sisältää kuviossa 2a esitetyn nukleotidien 251 ja 694
välisen sekvenssin ja koodaa

lymfotoksiinia, jossa ei ole välisekvenssejä, joil-
le ei suoriteta translaatiota, eikä sen organismin, josta
30 DNA on peräisin, muita proteiineja koodaavaa DNA:ta.

12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen nukleiinihappo,
t u n n e t t u siitä, että se sisältää kuviossa 2a esi-
tetyn nukleotidien 182 ja 694 välisen sekvenssin.

13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen nukleiinihappo, t u n n e t t u siitä, että se sisältää kuviossa 2a esitetyn nukleotidien 80 ja 694 välisen sekvenssin.

5 14. Patenttivaatimuksen 11 mukainen nukleiinihappo, t u n n e t t u siitä, että se koodaa ihmisen lymfotoksiinia.

15. Patenttivaatimuksen 14 mukainen nukleiinihappo, t u n n e t t u siitä, että DNA:ssa ei ole intronia nukleotidien 284 ja 285 välissä.

10 16. Patenttivaatimuksen 15 mukainen nukleiinihappo, t u n n e t t u siitä, että se on cDNA.

17. Patenttivaatimuksen 11 mukainen nukleiinihappo, t u n n e t t u siitä, että se on kovalenttisesti leimattu määritettävissä olevalla aineella.

15 18. Patenttivaatimuksen 11 mukainen nukleiinihappo, t u n n e t t u siitä, että se koodaa lymfotoksiinivarianttia.

19. Replikoituva vektori lymfotoksiinin ekspressiota varten, t u n n e t t u siitä, että se sisältää patenttivaatimuksen 11 mukaisen nukleiinihapon, joka on transkriptionaalisen promottorisekvenssin ja lymfotoksiinia koodaavan nukleiinihapon transkription ja translaation lopetuksen säätelysekvenssin säätelyn alla.

20 20. Patenttivaatimuksen 17 mukainen vektori, 25 t u n n e t t u siitä, että se lisäksi käsittää bakteeriperäisen promoottorin, joka on toiminnallisesti liitetty lymfotoksiinia koodaavaan nukleiinihappoon.

21. Patenttivaatimuksen 17 mukainen vektori, 30 t u n n e t t u siitä, että DNA koodaa lymfotoksiinin ja bakteeriperäisen erityssignaalin fuusion.

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett lymfotoxin med den i figur 2a angivna aminosyrasekvensen, en variant eller ett fragment av detta med den biologiska aktiviteten hos proteinet som anges i figur 2a, eller fusionsprodukter av dessa, vilka förutom proteinet med lymfotoxinaktivitet även innehåller bakterieprotein; medelst rekombinant-DNA-teknik, k ä n n e t e c k n a t därav, att

10 a) en nukleinsyra som kodar för lymfotoxin framställs;

b) en vektor för expression av lymfotoxinet konstrueras genom att nukleinsyran från steg a) binds funktionellt vid en vektor innehållande en transkriptionell promotorsekvens och kontrollsekvenser för avslutning av transkription och translation av nukleinsyran som kodar för lymfotoxin;

c) en bakterievärd transformeras med vektorn från steg b);

20 d) värdcellen från steg c) odlas;

e) lymfotoxin får ackumuleras i odlingen; och

f) lymfotoxinet tillvaratas från odlingen, valbart under användning av en antikropp, som neutraliserar lymfotoxinets cytolytiska aktivitet och som inte omfattar icke-neutraliserande antikroppar.

2. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att nukleinsyran kodar för humant prelymfotoxin och varierande glykosylerat lymfotoxin tillvaratas ur cellodlingen.

30 3. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att grupperna -34 - -1 har avlägsnats från lymfotoxinvarianten och att den vidare innehåller en insert omfattande åtminstone en aminosyra.

4. Förfarande enligt patentkrav 3, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att inserten är en fusion av en po-
lypeptid med karboxyländan av lyfotoxinet.

5 5. Förfarande enligt patentkrav 4, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att polypeptiden binds vid lyf-
toxinet via ett proteolytiskt enzyms hydrolysställe.

6. Förfarande enligt patentkrav 5, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att stället omfattar lys-lys eller
lys-arg.

10 7. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att grupperna -34 - -1 i figur 2a
ersatts med metionyl eller formylmetionyl.

8. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att grupperna -34 - +22 ersatts med
15 metionyl eller formylmetionyl.

9. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att lyfotoxinvarianten omfattar att
lysin i position +28 ersatts med histidin.

10 10. Förfarande enligt patentkrav 1, k ä n n e -
t e c k n a t därav, att lyfotoxinvarianten omfattar en
substitution, deletion eller insertion i området som be-
räknat från leucyl +1 omfattar ca 30 grupper.

11. Nukleinsyra, k ä n n e t e c k n a d därav,
att den innehåller den i figur 2a angivna sekvensen mellan
25 nukleotiderna 251 och 694 och kodar för ett lyfotoxin som
inte innehåller mellansekvenser som inte transleras och
inte DNA, som kodar för andra proteiner i organismen, från
vilken DNA:t härstammar.

12. Nukleinsyra enligt patentkrav 11, k ä n n e -
30 t e c k n a d därav, att den innehåller den i figur 2a
angivna sekvensen mellan nukleotiderna 182 och 694.

13. Nukleinsyra enligt patentkrav 11, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den innehåller den i figur 2a
angivna sekvensen mellan nukleotiderna 80 och 694.

14. Nukleinsyra enligt patentkrav 11, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den kodar för humat lymfotoxin.

5 15. Nukleinsyra enligt patentkrav 14, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att DNA:t inte innehåller någon int-
ron mellan nukleotiderna 284 och 285.

16. Nukleinsyra enligt patentkrav 15, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den är cDNA.

10 17. Nukleinsyra enligt patentkrav 11, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den är kovalent märkt med ett
detekterbart ämne.

18. Nukleinsyra enligt patentkrav 11, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den kodar en lymfotoxinvariant.

15 19. Replikerbar vektor för expression av lymfo-
toxin, k ä n n e t e c k n a d därav, att den innehåller
en nukleinsyra enligt patentkrav 11, som står under kont-
roll av en transkriptionell promotorsekvens och kontroll-
sekvenser för avslutning av transkription och translation
av nukleinsyran som kodar för lymfotoxin.

20 20. Vektor enligt patentkrav 19, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att den vidare omfattar en bakteri-
ell promotor som bundits funktionellt vid nukleinsyran som
kodar för lymfotoxin.

25 21. Vektor enligt patentkrav 19, k ä n n e -
t e c k n a d därav, att DNA:t kodar för en fusion av
lymfotoxin och en bakteriell sekretionssignal.

M L P G V G L T P S A A Q T A R Q H P K M H L A H S T L K P
 1 2 3 4 5 6
 TCTAGAATTATGCTGCCAGGCGTAGGTCCTGACTCCATCTGCAGCACAGACTGCACGCCAGCACCCAAAGATGCACCTGGCACACTCAACTCTGAAGCCAG
 AGATCTTAAATACGACGGTCCGCATCCAGACTGAGGTAGACGTCGTGTC TGACGTGCGGTGCGGTGTTCTACGTGGACCGTGTGAGTTGAGACTTCGGTC
 58 57 56 55 54 53
 XBAI

A A H L I G D P S K Q N S L L W R A N T D R A F L Q D G F S L S N N
 CAGCACACCTGATCGGGGATCCATCCAAACAGAACTCCCTGCTGTGGCGCGCAACACCGATCGCGCATTCCTGCAAGATGGCTTCTCCCTGTGCCAACAA
 GTCGTGGGACTAGCCCCTAGGTAGGTTGTCTTGAGGGACGACACCGCGCTTTGTGGCTAGCGCGGTAAAGGACGTTCTACCGAAGAGGGACAGGTTGTT
 7 8 9 10 11 12 48 49 50 51 52 47
 BAMHI

S L L V P T S G I Y F V Y S Q V V F S G K A Y S P K A T S S P L Y
 13 14 15 16 17 18
 CTCCCTGCTGGTGCCAACTCCGGTATCTACTCACAGGTGGTGTCTCCGGTAAAGCTTACTCCCCAAAGGCAACTTCTCTCCCACTGTAC
 GAGGGACGACCACGGTTGGAGGCCATAGATGAAGCATATGAGTGTCCACCACCAAGAGGCCATTTCGAATGAGGGGTTTCCCGTTGAAGGAGGGGTGACATG
 46 45 44 43 42 41
 HINDIII

L A H E V Q L F S S Q Y P F H V P L L S S Q K M V Y P G L Q E P W
 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40
 CTGGCACACGAGGTGCAACTGTTCTCTCCAGTAICCATTTTCACGTGCCACTGCTGTCTCCAGAAAAATGGTGTACCCGGGTCTGCAGGAGGCCATGGC
 GACCGTGTGCTCCACGTTGACAAGAGGAGGGGTATAGGTAAAGTGCACGGTGACGACAGAGGGTCTTTTACCACATGGGGCCACAGCGTCTTCGGTACCG

L H S M Y H G A A F Q L T Q G D Q L S T H T D G I P
 25 26 27 28 29
 TGCACCTCCATGTATCACGGTGCAGCATTCAGCTGACTCAGGCTGACAGGAAATTCATAGATCT
 ACGTGAGGTACATAGTGCCACGTCGTAAAGTCGACTGAGTCCCACCTGGTCGACAGCTGAGTGACTGCCTTAAGGTATCTAGA
 30 31 32 33 34
 BGL II

Fig. 1A.

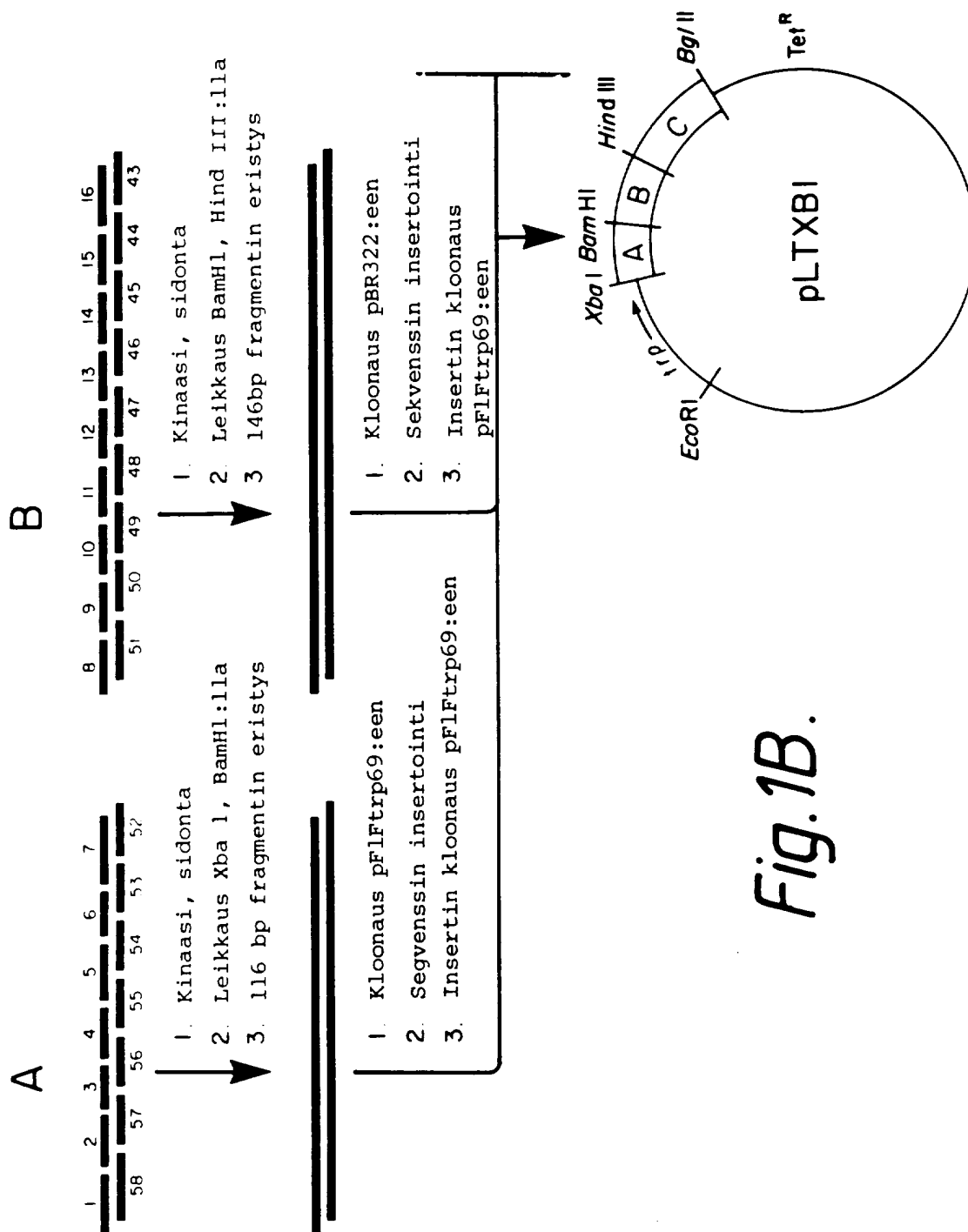
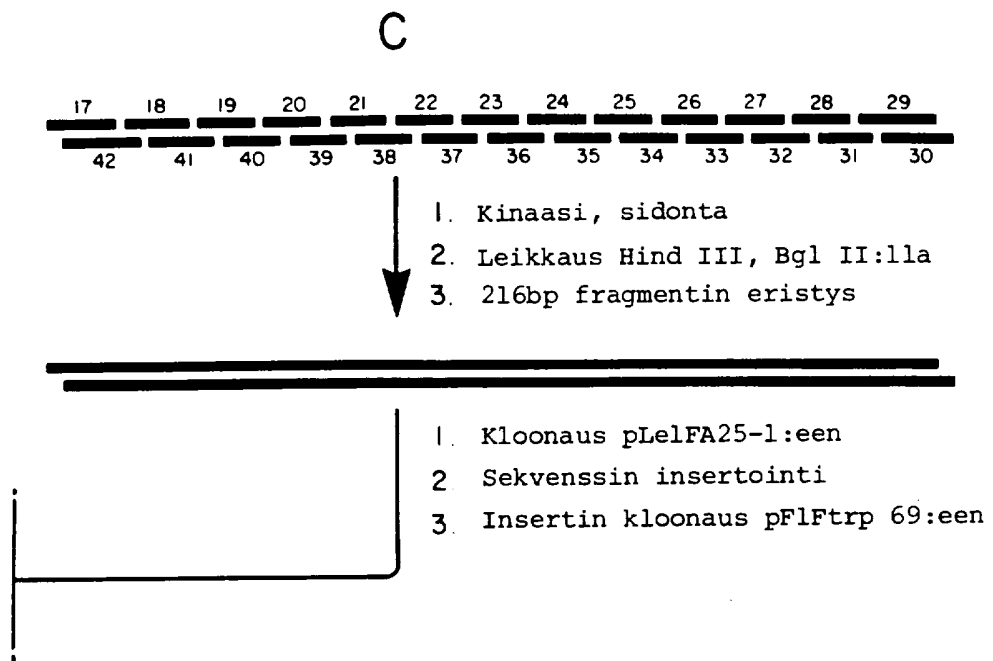


Fig. 1B.

*Fig. 1B*

arg leu phe leu pro arg val cys gly thr thr leu his leu leu leu gly leu leu val leu leu pro
 CGT CTC TTC CTC CCA AGG GTG TGT GGC ACC ACC CTA CAC CTC CTC CTT CTG GGG CTG CTG CTG GTT CTG CTG CCT
 100 -20 -10 150

gly ala gln gly Leu Pro Gly Val Gly Leu Thr Pro Ser Ala Ala Gln Thr Ala Arg Gln His Pro Lys Met His
 GGG GCC CAG GGG CTC CCT CCT GGT GGT GGC CTC ACA CCT TCA GCT GCC CAG ACT GCC CGT CAG CAC CCC AAG ATG CAT
 1 10 200

Leu Ala His Ser Thr Leu Lys Pro Ala Ala His Leu Ile Gly Asp Pro Ser Lys Gln Asn Ser Leu Leu Trp Arg
 CTT GCC CAC AGC ACC CTC AAA CCT GCT GCT CAC CTC ATT GGA GAC CCC AGC AAG CAG AAC TCA TCG CTC TGG AGA
 250 300

Ala Asn Thr Asp Arg Ala Phe Leu Gln Asp Gly Phe Ser Leu Val Pro Thr Ser Gly
 GCA AAC ACG GAC CGT GCC TTC CTC CAG GAT GGT TTC TCC TTG AGC AAC AAT TCT CTC CTG GTC ACC ACC AGT GGC

Ile Tyr Phe Val Tyr Ser Gln Val Val Phe Ser Gly Lys Ala Tyr Ser Pro Lys Ala Thr Ser Ser Pro Leu Tyr
ATC TAC TTC GTC TAC TCC CAG GTG GTC TTC TCT TCT GGG AAA GCC TAC TCT CCC AAG GCC ACC TCC TCC CCA CTC TAC

100 110 120
 Leu Ala His Glu Val Gln Leu Phe Ser Ser Gln Tyr Pro Phe His Val Pro Leu Leu Ser Ser Gln Lys Met Val
 CTG GCC CAT GAG GTC CAG CTC TTC TCC TCC CAG TAC CCC TTC CAT GTG CCT CTC CTC AGC TCC CAG AAG ATG GTG

Fig. 2A.

Tyr Pro Gly Leu Gln Glu Pro Trp Leu His Ser Met Tyr His Gly Ala Ala Phe Gln Leu Thr Gln Gly Asp Gln
 TAT CCA GGG CTG CAG GAA CCC TGG CTG CAC TCG ATG TAC CAC GGG GCT GCG TTC CAG CTC ACC CAG GGA GAC CAG
 550 PstI 130 140 600

 Leu Ser Thr His Thr Asp Gly Ile Pro His Leu Val Leu Ser Pro Ser Thr Val Phe Phe Gly Ala Phe Ala Leu
 CTA TCC ACC CAC ACA GAT GGC ATC CCC CAC CTA GTC CTC AGC CCT AGT ACT GTC TTC TTT GGA GCC TTC GCT CTG
 150 160 170 650

 TAG AACTTGGAAAAATCCAGAAAGAAAAAATAATTGATTTCAAGACCTTCTCCCCATTCTGCCTCCATTCTGACCATTTTCAGGGGTCGTCACCCACCTC
 700 750

 TCCTTTGGCCATTCCAACAGCTCAAGTCTTCCCTGATCAAGTCACCGGAGCTTTCAAAGAAGGAATTCTAGGCATCCCAGGGGACCCACACTCCCTGAAC
 800 850 EcoRI

 CATCCCTGATGTCTGTGGCTGAGGATTTCAAGCCTGCCTAGGAATTCACAGCCCAAGCTGTTGGTCTTGTCCACCAGCTAGGTGGGGCCTAGATCCA
 900 950

 CACACAGAGGAAGAGCAGGCACATGGAGGAGCTTGGGGGATGACTAGAGGCAGGGGGGACTATTATGAAGGCCAAAAAATTAAATTATTTATG
 1000 1050

 GAGGATGGAGAGAGGGAATAATAGAAGAACATCCAAGGAGAAACAGAGACAGGCCCAAGAGATGAAGAGTGAGAGGGCATGCGCACAGGCTGACCAAGA
 1100 1150

 GAGAAAGAAGTAGGCATGAGGGATCACAGGGGCCCCAGAGAGGCAGGGAAAGGCTCTGAAAGCCAGCTGCCGACCAGAGCCCCACACGGAGGCATCTGCACC
 1200 1250

 CTCGATGAAGCCCCAATAAACCTCTTTTCTCTGAAAAAATAAAAAA 3'
 1300

Fig. 2A

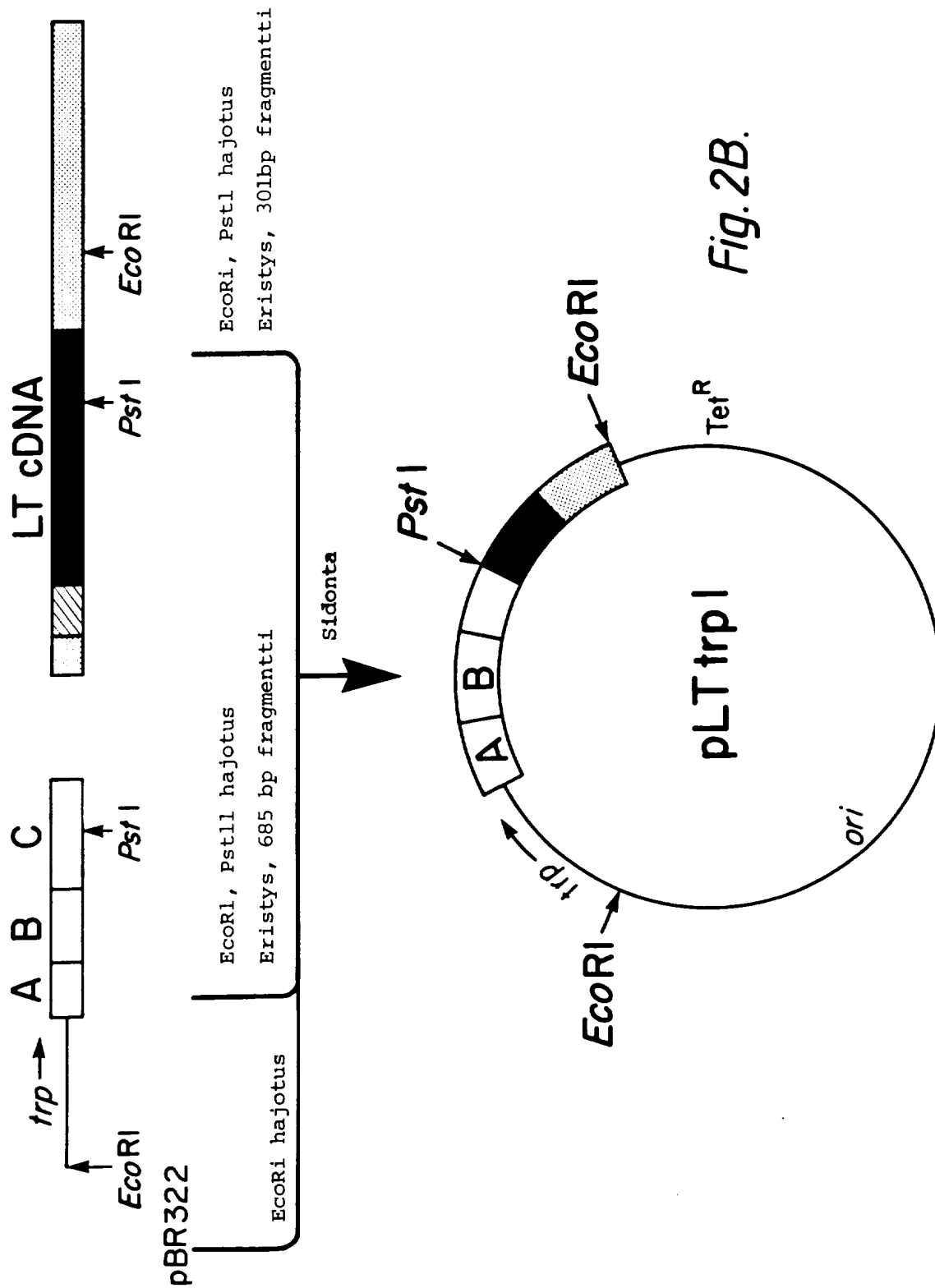


Fig. 2B.

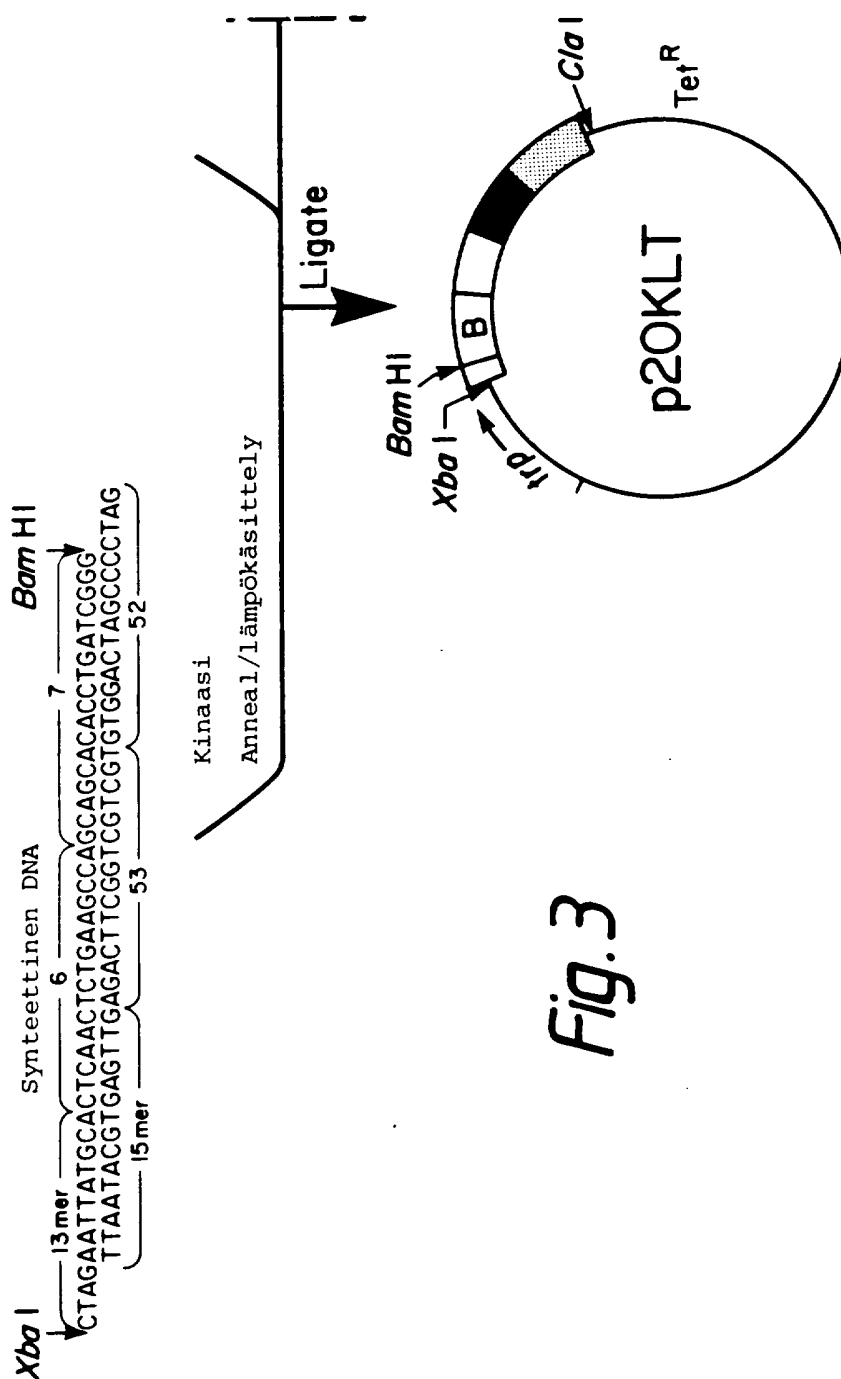
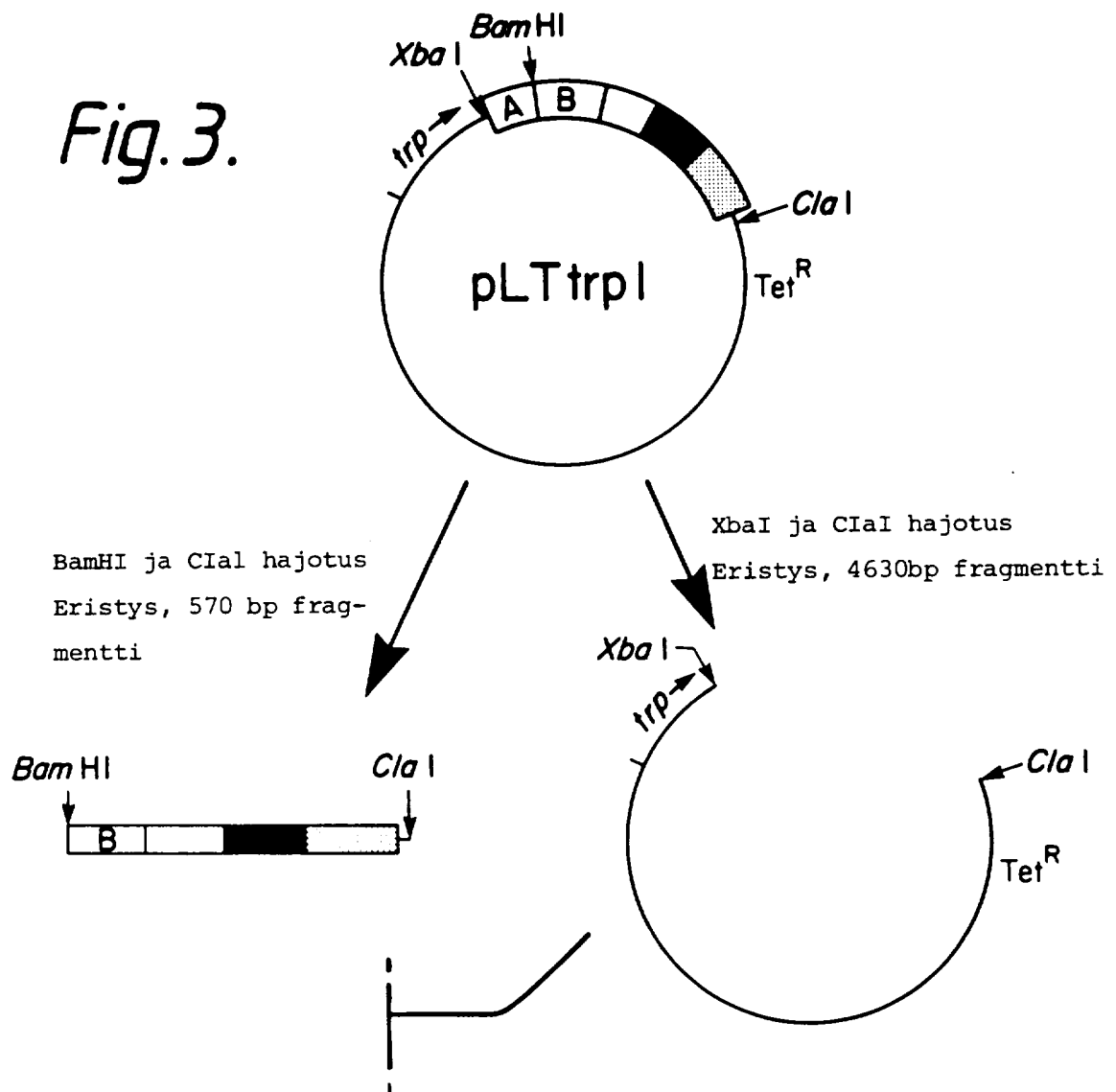


Fig. 3

Fig. 3.

Humaani Hiiri Härkä yhtäpitävyys	30										40									
	LEU	LYS	PRO	ALA	ALA	HIS	LEU	ILE	GLY	ASP	PRO	SER	LYS	GLN						
	LEU	LYS	PRO	ALA	ALA	HIS	LEU	VAL	GLY	TYR	PRO	SER	LYS	GLN						
	LEU	LYS	PRO	ALA	ALA	HIS	LEU	VAL	GLY	ASP	PRO	SER	ASN	PRO						
Humaani Hiiri Härkä yhtäpitävyys	50										70									
	ASN	SER	LEU	LEU	TRP	ARG	ALA	ASN	THR	ASP	ARG	ALA	PHE	LEU	GLN	ASP				
	ASN	SER	LEU	LEU	TRP	ARG	ALA	ASN	ALA	ASP	ARG	ALA	PHE	LEU	ARG	HIS				
	ARG	THR	LEU	THR	LEU	ARG	ALA	ASN	THR	ASP	ARG	ALA	PHE	LEU	PRO	THR				
Humaani Hiiri Härkä yhtäpitävyys	60										80									
	GLY	PHE	SER	LEU	SER	ASN	ASN	SER	LEU	LEU	VAL	PRO	THR	SER						
	GLY	PHE	SER	LEU	SER	ASN	ASN	SER	LEU	LEU	ILE	PRO	THR	SER						
	ALA	PHE	SER	LEU	SER	ASN	ASN	SER	LEU	LEU	VAL	PRO	THR	SER						
Humaani Hiiri Härkä yhtäpitävyys	80										100									
	GLY	ILE	TYR	PHE	VAL	TYR	SER	GLN	VAL	VAL	PHE	SER	GLY	LYS	ALA	TYR				
	GLY	LEU	TYR	PHE	VAL	TYR	SER	GLN	VAL	VAL	PHE	SER	GLY	GLU	SER	CYS				
	GLY	LEU	TYR	PHE	VAL	TYR	SER	GLN	VAL	VAL	PHE	SER	GLY	ARG	GLY	CYS				
Humaani Hiiri Härkä yhtäpitävyys	90										110									
	GLY	ILE	TYR	PHE	VAL	TYR	SER	GLN	VAL	VAL	PHE	SER	GLY	LYS	ALA	TYR				
	GLY	LEU	TYR	PHE	VAL	TYR	SER	GLN	VAL	VAL	PHE	SER	GLY	GLU	SER	CYS				
	GLY	LEU	TYR	PHE	VAL	TYR	SER	GLN	VAL	VAL	PHE	SER	GLY	ARG	GLY	CYS				

Fig. 4(II)

Humaani	90	SER	PRO	LYS	ALA	THR	SER	SER	PRO	LEU	TYR	LEU	ALA	HIS	GLU	100
Hiiri		SER	PRO	ARG	ALA	ILE	PRO	THR	PRO	ILE	TYR	LEU	ALA	HIS	GLU	
Härkä		PHE	PRO	ARG	ALA	THR	PRO	THR	PRO	LEU	TYR	LEU	ALA	HIS	GLU	
yhtäpitävyys		PRO	PRO	ALA	ALA		PRO		PRO	TYR	LEU	ALA	HIS	GLU		
Humaani	110	VAL	GLN	LEU	PHE	SER	SER	GLN	TYR	PRO	PHE	HIS	VAL	PRO	LEU	SER
Hiiri		VAL	GLN	LEU	PHE	SER	SER	GLN	TYR	PRO	PHE	HIS	VAL	PRO	LEU	SER
Härkä		VAL	GLN	LEU	PHE	SER	PRO	GLN	TYR	PRO	PHE	HIS	VAL	PRO	LEU	SER
yhtäpitävyys		VAL	GLN	LEU	PHE	SER		GLN	TYR	PRO	PHE	HIS	VAL	PRO	LEU	SER
Humaani	120	SER	GLN	LYS	MET	VAL	TYR	PRO	GLY	LEU	GLN	GLU	PRO	TRP	LEU	130
Hiiri		ALA	GLN	LYS	SER	VAL	TYR	PRO	GLY	LEU	GLN	GLY	PRO	TRP	VAL	
Härkä		ALA	GLN	LYS	SER	VAL	CYS	PRO	GLY	PRO	GLN	GLY	ARG	TRP	VAL	
yhtäpitävyys		GLN	GLN	LYS		VAL	PRO	PRO	GLY	GLN	GLN			TRP		
Humaani	140	HIS	SER	MET	TYR	HIS	GLY	ALA	ALA	PHE	GLN	LEU	THR	GLN	GLY	ASP
Hiiri		ARG	SER	MET	TYR	GLN	GLY	ALA	VAL	PHE	LEU	LEU	SER	LYS	GLY	ASP
Härkä		ARG	SER	VAL	TYR	GLN	GLY	ALA	VAL	PHE	LEU	LEU	THR	ARG	GLY	ASP
yhtäpitävyys		SER		TYR	TYR		GLY	ALA		PHE	LEU	LEU			GLY	ASP

Fig. 4(III)

	150	160
Humaani	LEU SER THR HIS THR ASP GLY ILE PRO HIS LEU VAL LEU SER	
Hiiri	LEU SER THR HIS THR ASP GLY ILE SER HIS LEU HIS PHE SER	
Härkä	LEU SER THR HIS THR ASP GLY ILE SER HIS LEU LEU LEU SER	
Yhtäpitävyys	LEU SER THR HIS THR ASP GLY ILE HIS LEU	SER

Human1
Hiliri
Härkä
yhtäpitävyy's

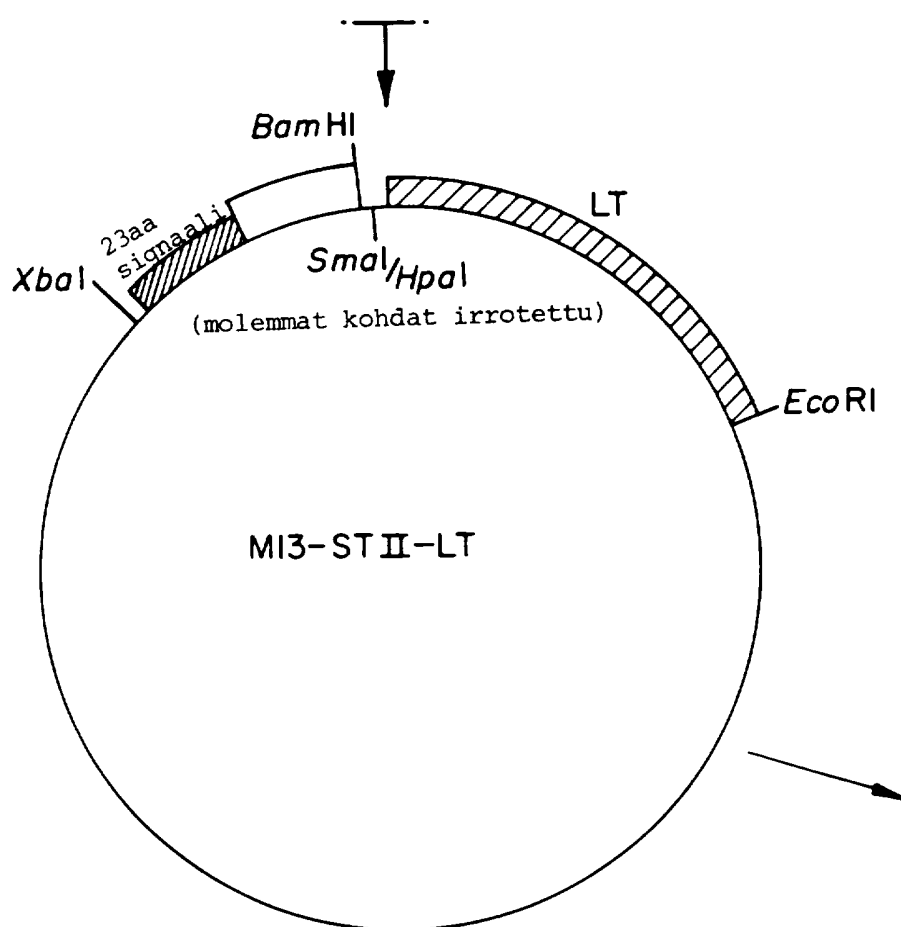


Fig. 5A

Fig. 5A.

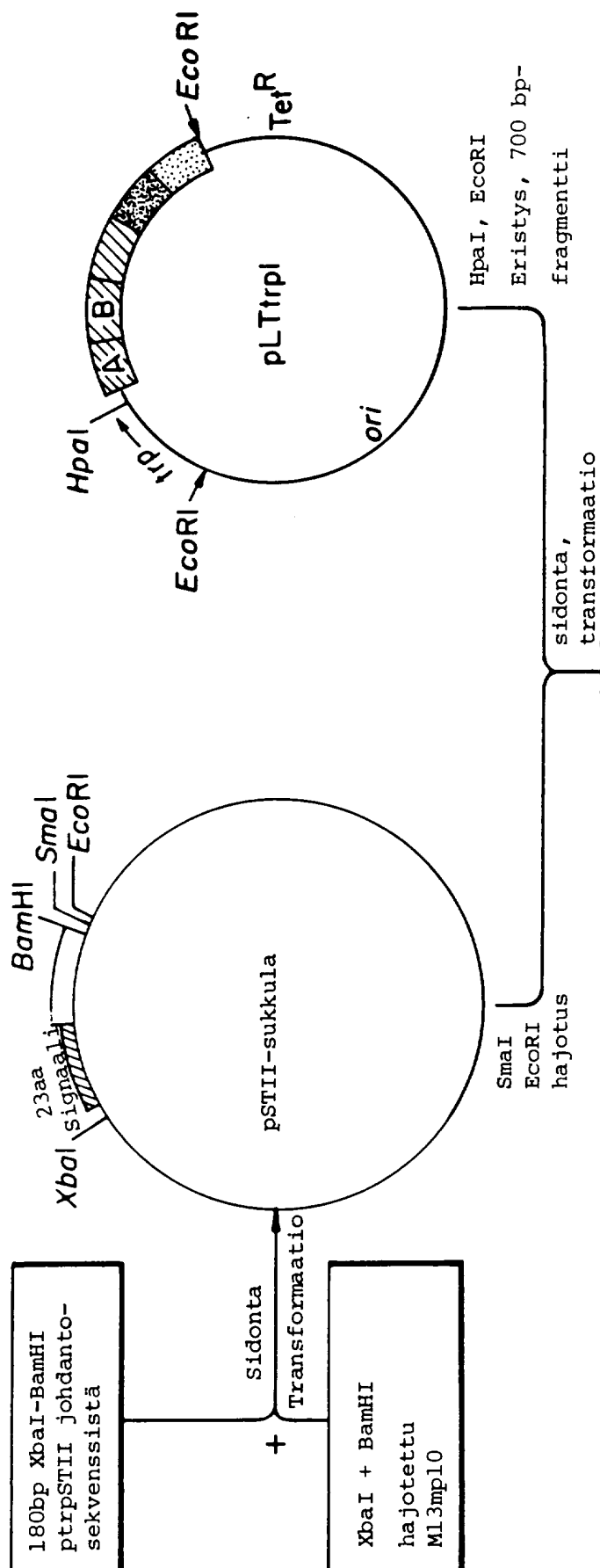
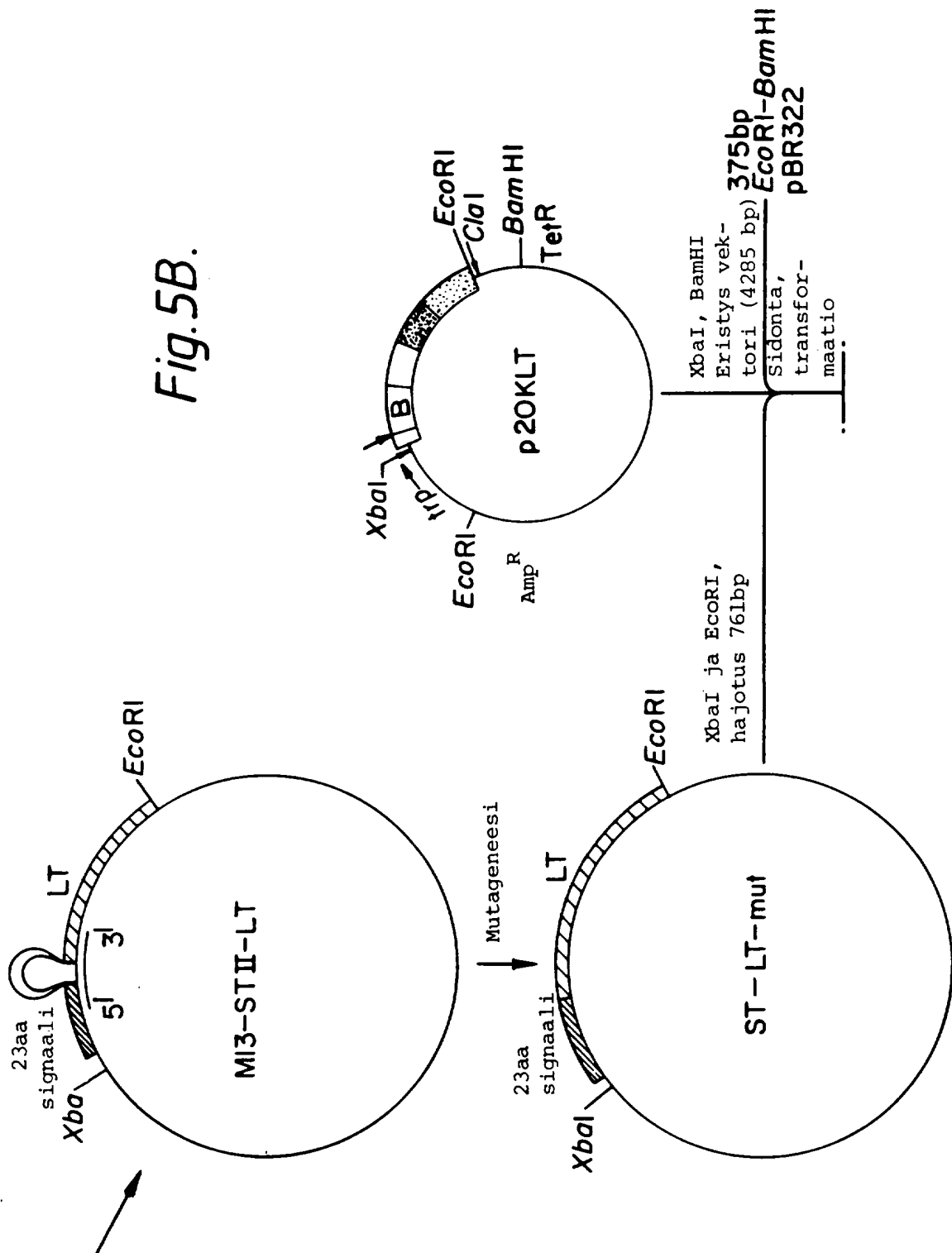
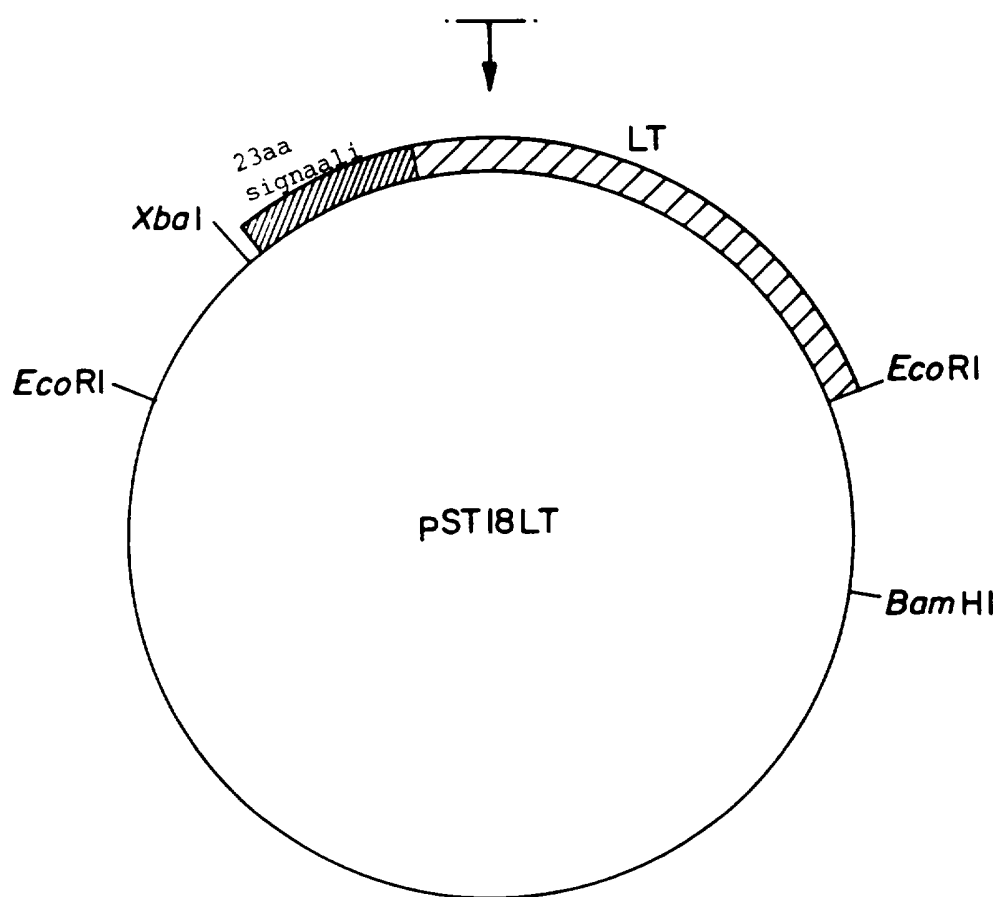


Fig. 5B.



*Fig. 5B*