

(19) HU
MAGYAR
NÉPKÖZTÁRSASÁG



ORSZÁGOS
TALÁLMÁNYI
HIVATAL

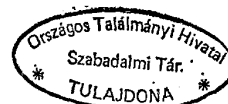
SZABADALMI LEÍRÁS

(11)
193053 (13)B

(22) A bejelentés napja: 84.08.29. (21) (3247/84)
(33) DE:
(32) 83.08.30.
(31) (P 33 31 108.0)

(51) Int.Cl.₄
C 12 N 5/00
C 07 K 15/06
A 61 K 39/395
C 12 P 21/00
A 61 K 35/26

(41)(42) A közzététel napja: 1985 jun. 28
(45) Megjelent: 1988 jun. 6



(72) Feltaláló(k):
dr. Adolf Günther, Bécs, AT

(73) Szabadalmas:
Boehringer Ingelheim International GmbH.,
Ingelheim am Rhein, DE

(54) ELJÁRÁS LIMFOTOXIN ÉS LIMFO- TOXIN-mRNS ELŐÁLLÍTÁSÁRA

(57) KIVONAT

A találmány tárgya új eljárás limfotoxin és limfotoxin-mRNS előállítására herpes vírussal transzformált T-limfocita 1670 sejtvonal-

nak folyamatos tenyésztésben való inkubálása, majd az így képződött sejtermékek elválasztása révén.

Ismeretes a szakirodalomból, hogy az emlősállatok bizonyos sejtjei, megfelelő stimulálás után, in vitro ún. limfotoksinok termelésére képesek [például: Evans, Canoer Immunol. Immunother., 12, 181-190 (1983); Granger és munkatársai, Biology of the Lymphokines, 141-180. oldal, Academic Press (1979)]. Egy adott fajnál a limfotoksin — in vitro — nem egy-egy sejt-protein: egy sor szubtypusát írták le, melyek molekulásúly, töltés és stabilitás szempontjából különböznek (lásd például Granger és munkatársai fenti közlését). Humán vonatkozásban például négy limfotoksin osztály különböztető meg molekulásúly szerint: a γ LT 10.000-20.000, a β LT 35.000-50.000, az α LT 70.000-90.000, és az LT-komplex molekulásúlya 200.000-600.000 közé esik.

A limfotoksinok in vitro az alábbi tulajdonságokkal rendelkeznek:

- a) megakadályozzák a sejtek malignus transzformációját [Evans és munkatársai, Int.J. Cancer 27, 45-49 (1981), Ransom és munkatársai, J. Natl. Cancer Inst. 69, 741-744 (1982)];
- b) tumorsejtekre citosztatikus, sőt citolitikus hatást fejtenek ki [Evans és munkatársai, Immunopharmacology, 3, 347-359 (1981)], és
- c) növelik a tumorsejtek érzékenységét a szervezet sejt-közvetítette immunitásának védekező rendszerével szemben [Evans és munkatársai, Cell.Immunol., 63, 1-15 (1981), Ransom és munkatársai, Int.J.Cancer., 29, 451-458 (1982)].

A szakirodalomból továbbá az is ismert, hogy a limfotoksin készítmények állatmodellben tumorok regresszióját is előidézhetik [Kahn és munkatársai, Proc.Soc.Exptl.Biol. Med., 169, 291-294 (1982)]. Ennélfogva a limfotoksinoknak nagy jelentősége van rosszindulatú megbetegedések profilaxisában és terápiájában.

A limfotoksinok előállítására eddig megismert eljárások a legtöbb esetben primer sejtekből indulnak ki, például az emberi perifériás vérből vagy mandulákból nyert leukocitakészítményekből [Williams és munkatársai, J.Immunol., 130, 518-520 (1983)], egér lépsejtekből [Aksamit és munkatársai, Infect.Immun., 36, 1028-1035 (1982) és Trivers és munkatársai, J.Immunol., 117, 130-135 (1976)], vagy szíriai hörcsög vagy tengerimalac hasüregének leukocitáiból [Evans és munkatársai Int.J.Cancer, 27, 45-49 (1981)]. Ezeket a sejteket először nagymolekulájú mitogénekkal, például fitohemagglutininnel kell inkubálni, hogy a limfotoksin termelése meginduljon. Így eddig a B-limfocita sejtvonal tenyészetek felülűszóiban csak igen kis limfocita aktivitás volt kimutatható. [Grenger és munkatársai, J.Immunol., 104, 1476 (1970) és Amino és munkatársai, J.Immunol., 113, 1334-1345 (1974)].

Minthogy a limfotoksinok termelésére eddig alkalmazott módszerekkel csak kis mennyiségeket, alacsony tisztasággal lehetett előállítani,

ni, az eddig előállított limfotoksinokat nem lehetett sem homogenitásig tisztítani, sem megfelelő mennyiségben antineoplasztikus hatásának állatmodellen történő széleskörű vizsgálatok céljára hozzáférhetővé tenni. Így eddig még biológiailag aktív limfotoksin-mRNS-t sem lehetett kimutatni; márpedig ez a feltétele a limfotoksin gén molekuláris klónozásának a géntechnológia módszerei segítségével.

A jelen találmánynak fentiek szerint az az alapfeladata, hogy eljárást szolgáltatson megfelelő mennyiségű és tisztaságú limfotoksin és limfotoksin-mRNS előállítására.

Találmányunkban megállapítjuk, hogy a majmok — különösen a Saguinus faj — T-limfocita 1670 sejtvonala, melyet vírus fertőzés segítségével — herpes vírussal, mint a Herpes vírus saimiri vagy Herpes vírus ateles — in vitro vagy in vivo transzformálunk és folyamatos tenyészetben fenntartunk, megfelelő tápoldatban spontán, azaz további indukció nélkül, tekintélyes mennyiségű limfotoksin és limfotoksin-mRNS-t termel.

Megállapítottuk továbbá, hogy ha úgynevezett stimulátort adunk a tenyészethez, például valamilyen irodalomból jól ismert daganatkeltő anyagot, például diterpén származékot, előnyösen Tiglian- vagy Daphnan-típusút, ilyen a mezerein (a Daphne mezereum = farkasboroszlán nevű növény kérgének alkotórésze), vagy egy forbol-észtert, előnyösen a 12-O-tetradekanoil-forbol-13-acetátot [=TPA; Diamond és munkatársai, Advances in Cancer Research, 32. kötet, 1-74 oldal, Academic Press (1980); Hecker, Carcinogenesis, II. kötet, Mechanisms of Tumor Promotion and Carcinogenesis, 11-48 oldal, Raven Press, New York (1978)] 1-1000 ng/ml koncentrációban, akkor a limfotoksin és limfotoksin-mRNS termelés megnövekszik.

Tápoldatként számításba jöhetnek a szokásos szérumentes és szérum tartalmú tápoldatok, például az Eagle féle Minimum Essential Medium (Eagle MEM) vagy a Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 (RPMI1640), melyekhez fetális borjúsérumot és antibiotikumokat is adhatunk. Előnyös a penicillin és a streptomycin és a fetális borjúsérum 10%-ig.

Az előnyös találmány szerinti eljárás limfotoksin proteinek termelésére a következő: szérum tartalmú — meghatározott körülmények között szérumentes is lehet — tápoldatban — például RPMI1640 oldatban — melyhez 10-100 ng/ml TPA-t vagy mezerein-t adunk stimulátor gyanánt, transzformált sejteket tenyésztünk 1-7 napig, előnyösen 3-4 napon át, majd a képződött limfotoksinat a tenyészet felülűszójából — ismert módszerekkel — elválasztjuk, koncentrálnak és tisztítjuk. Különösen előnyösen úgy végezzük ezt az eljárást, hogy a sejteket a szérum tartalmú tápoldatból a kezdeti elszaporítás után kevés szérumot tartalmazó, vagy még előnyösebben, szérumentes tápoldatba visszük át.

Limfotoxin-mRNS termelésénél az előnyös találmány szerinti eljárás a következő: szérumban tartalmú tápoldathoz, például RPMI1640-hez 10% fetális borjúsérumot és 10-100 ng/ml TPA-t vagy mezerein-t adunk stimulátorként, s a transzformált sejteket ebben a tápoldatban inkubáljuk 6-48 óráig, előnyösen 12-24 óráig, végül a sejteket elválasztjuk, majd roncsoljuk és a mRNS-t ismert eljárással izoláljuk.

A sejt-tenyésztet termékeinek izolálásánál és az így kapott limfotoxin tisztításánál alkalmasnak mutatkozik a kontrollált pórusú üvegdarab (pórus controlled glass = PCG) történő kromatografálás (először itt került alkalmazásra); a sejtmembrán roncsolása és a sejtmag eltávolítása után a limfotoxin-mRNS-nek például fenollal való extrahálása különösen alkalmasnak bizonyul.

A limfotoxin további tisztítása például HPLC (high performance liquid chromatography) alkalmazásával történik.

Az így kapott limfotoxin — molekulasúly $60.000 \pm 15\%$ — például vizes izotóniás oldatban, profilaxis céljára és tumorsejtek ellen alkalmazható.

A technika állásával szemben a találmány szerinti eljárás az alábbi előnyökkel rendelkezik:

1. Korlátlan élettartalmú, homogén sejt populációt alkalmaz, s a sejtek szaporítása tetszés szerinti méretekre növelhető;
2. Ezekben a tenyészetekben a limfotoxin termelés spontán történik, azaz nincs szükség nagymolekulájú mitogének adagolására;
3. A limfotoxin termelés alacsony molekulasúlyú stimulátorokkal tovább növelhető;
4. Szérummentes tápoldatban a limfotoxin termelés kihozatala magas, így kiváló

Sejtvonal Eredet
(transzformáló
herpes vírus = HV)

1670 Saguinus oedipus
egy tumoros állat lépe
(HV saimiri)

Irodalom:

A = Fleckenstein és munkatársai, Int. J. Cancer, 19, 546—554 (1977)

B = Falk és munkatársai, Bacteriol. Proc. 38, 191 (1972)

C = Kaschka—Dietrich és munkatársai, J. Virol., 44, 295—310 (1982)

Összefoglaló közlemény Fleckenstein, Biochem. Biophys. Acta 560, 301—342 (1979)

Nagyobb mennyiségű sejt előállításához álló tenyészetek helyett rázott tenyészeteket alkalmazunk. Ekkor a sejteket (az 1670 sejtvonalat) például 10% fetális borjúsérumot tartalmazó RPMI1640 tápoldatban 1 vagy 2 literes Erlenmeyer lombikokban rotációs rázógépen tenyésztjük (az 1 literes

kiindulási anyagot kaphatunk a további proteinkémiai tisztítási eljárásokhoz;

5. A sejtekből izolált RNS-nek közvetlenül kimutatható limfotoxin-mRNS aktivitása van, így kiváló kiindulási anyagot képez a mRNS tisztításához, amely megint lényeges feltétele a mRNS molekuláris klónozásának. A klónozott majom-limfotoxin-mRNS-t ezután, ismert eljárás szerint, próba-anyagként lehet alkalmazni homológ humán limfotoxin-mRNS, illetve a megfelelő gén izolálásánál.

A találmány szerinti eljárás módosításait a következő példákkal világítjuk meg anélkül, hogy a találmány oltalmi körét a példákra korlátoznánk.

1. példa

20 Limfotoxin termelés herpes vírussal transzformált majom T-limfocita sejtvonalakkal

Az alkalmazott 1670 sejtvonalat 10% fetális borjúsérumot, penicillint és streptomocint tartalmazó RPMI1640 tápoldatban tartjuk fenn, álló tenyészetben, 37°C-on, 95% levegőből és 5% széndioxidból álló atmoszférában. A tenyészeteket hetenként háromszor friss tápoldattal hígítjuk. A sűrű tenyészeteket minden kísérletben friss tápoldattal hígítjuk 1:2—1:3 arányban és mindig 5 ml-t teszünk a tenyésztő edényekbe. Három nap múlva centrifugálunk, majd a tenyésztet felülúszóját lefagyaszthatjuk és a vizsgálatig -20°C-on tároljuk.

Az alábbi táblázatban a sejtvonalból három különböző tenyésztet felülúszójából meghatározott limfotoxin aktivitásokat tüntetjük fel.

Irodalom Limfotoxin aktivitás

RE/ml

1. 2. 3.
kísérlet

A, B, C 88 83 77

lombik 0,5 liter tenyésztet, a 2 literes lombik 1 liter tenyésztet tartalmaz; a fordulat-szám percenként 40; hőmérséklet 37°C; normál atmoszféra) és hetenként háromszor friss tápoldattal hígítjuk fel 1:2—1:3 arányban. Ilyen módon minden további nélkül heti 10—100 liter nagyságrendű tenyésztet-felülúszó termelése válik lehetővé.

Az 1670 sejtek hosszú időn át termelnek limfotoxint: folyamatos tenyésztés mellett a tenyészetek felülúszóiban 9 hónap múlva sem észlelhető a limfotoxin aktivitás szignifikáns csökkenése.

A limfotoxin jellemzése

- 65 a) A limfotoxin aktivitás biológiai kimutatására a következő vizsgálati módszert

alkalmazzuk [Trivers és munkatársai által módosított eljárás, J. Immunol., 117, 130—135 (1976) és Evans, Cell. Immunol., 63, 1—15 (1981)].

L929 sejtvonalú transzformált egérsejteket tenyésztünk egy éjszakán át 1 microcurie aktívítású ^3H -timidin/ml tartalmú tápoldatban (előnyös a 10% fetális borjúsérumot tartalmazó Eagle MEM tápoldat), a tenyészetet ezután tripszinnel kezeljük és friss, 5% fetális borjúsérum tartalmú tápoldatban szuszpendáljuk. A szuszpenzióból 0,5 ml-eket, azaz kb. 30.000 sejtet, tenyésztő edényekbe (átmérő: 16 mm) pipettázunk és 3-6 órán át inkubáljuk. A vizsgálandó mintákból végül sorhígítást készítünk, s ezeket 3 napig inkubáljuk (minden inkubálás 37°C -on történik). A tenyészetek felülúszójának radioaktívítását folyadék-szintillációs számlálóval mérjük.

A következő táblázatban az 1670 sejtek egyik tenyészetének felülúszójában mért limfotoxin aktivitások eredményeit mutatjuk be. Minden hígításból 4 parallel tenyésztőedényt vizsgálunk. Csak a középértékeket adjuk meg, a standarddeviáció az első három hígításnál 3—4%, a legnagyobb hígításnál 6%. Az ebben a vizsgálatban használt tenyész-

levet sok száz ampullában lefagyasztjuk és minden limfotoxin vizsgálatnál referenciastandardként használjuk; aktivitását önkényesen 100 referencia-egység/ml-ben (RE/ml) állapítottuk meg. Az eredményeket az 1. ábra mutatja be.

A fent leírt biológiai limfotoxin teszt segítségével egy sor emberi T-limfocita sejtvonalat (MOLT-4, 1301, JURKAT, Karpas-45, CCRF-CEM és CCRF-HSB-2) vizsgáltunk meg összehasonlításul. A kezeletlen kontrollokhoz képest egyetlen esetben sem tudtuk kimutatni a ^3H -timidin felszabadulásának szignifikáns emelkedését.

b) Az 1670 sejtvonal tenyészet felülúszójában lévő limfotoxin aktivitásnak fizikai-kémiai jellemzésére a következő kísérleteket végeztük: hőterheléssel szembeni stabilitás, savanyú pH értékkel szembeni stabilitás, fagyasztás/olvasztás hatása a stabilitásra, nátrium-dodecil-szulfáttal (SDS) szembeni stabilitás, redukáló anyagokkal (2-merkapto-etanol) szembeni stabilitás, molekulásúly meghatározás magasnyomású folyadék-kromatografiával (HPLC). A stabilitási vizsgálatok eredményét az alábbi táblázatban mutatjuk be:

Kezelés

Limfotoxin aktivitás a kontroll-
érték százalékban

56°C - 5 órán át	68%
Fagyasztás/olvasztás ötször	108%
pH = 2,0 - 24 órán át 4°C-on	1%
0,1% SDS - 1 órán át 37°C-on	15%
0,1 mól 2-merkapto-etanol - 1 órán át 37°C-on	95%

Aktivitása stabil marad merkaptóetanolos kezeléssel és hevítéssel szemben, valamint többszöri fagyasztás/olvasztás ciklus hatásával szemben, pH = 2 hatására 24 órán belül aktivitását teljesen elveszti.

A hővel, pH-val, valamint a fagyasztás/olvasztással szembeni stabilitásra vonatkozó kísérleteket kezeletlen 1670 sejtek standard tenyészetével — 10% fetális borjúsérum jelenlétében — végeztük. A másik két kísérletet mezerein-el (20 ng/ml; lásd a 4. példát) kezelt 1670 sejtek tenyészetének felülúszójával (protein-tartalom: 1-2 mg/ml) végeztük, melyet kontrollált porúsú üvegdarával koncentráltunk és dúsítottunk. A tenyészetet SDS-el, illetve merkaptó-etanolal való inkubálás után 50-szeresére hígítottuk komplett tápoldattal (10% borjúsérum).

Az 1670 sejtekből származó limfotoxin molekulásúlyát HPLC-vel határoztuk meg (lásd a 2. ábrát).

1670 sejtek tenyészetének felülúszójából — melyet PCG-vel koncentráltunk — 200 μl -t HPLC-vel [WATERS berendezés; két I-125 oszlop; 20 mM nátrium-foszfát

(pH = 7), 1 M nátrium-klorid, 0,1% Tween 20 (polioxietilén-szorbitán-monolaureát, n = 20, mólsúly: körülbelül 1200), 25% propilén-glikol; 0,5 ml percenként] választunk el. 0,5 ml-es frakciókat szedünk és ezeket vizsgáljuk. A molekulásúly meghatározásánál az összehasonlításul szolgáló proteinek, a szérum-albumint, ovalbumint, tripszinogént és lizozimet ugyanabban a rendszerben választottuk el. A vizsgálat egyetlen aktivitás-csúcsot mutatott a $60.000 \pm 15\%$ molekulásúlynál.

c) Az 1670 sejtvonal tenyészet felülúszóinak növekedés gátló hatását egy sor transzformált (tumor-) sejtvonalon vizsgáltuk meg. Ezekben a vizsgálatokban a tumorsejteket Eagle MEM tápoldatot (kiegészítve 10% fetális borjúsérummal, penicillinnel és streptomocinnel) tartalmazó, 3 cm átmérőjű tenyésztő edényekbe visszük be (50.000 sejt edényenként) és néhány órával később táptalajt, vagy az 1670 sejtvonal standard tenyészetének felülúszóját adjuk hozzájuk (vég-koncentráció: 16 RE/ml; 3 ml/edény). Az edényeket 3—4 napig inkubáljuk 37°C -on, majd a sejtszámot minden edényben meghatározzuk (min-

den vizsgálatban két parallel edényt használtunk, az egyikhez limfotoxint, a másikhoz tápoldatot adunk). Három sejtvonal esetében a

sejtszámot naponta meghatároztuk. Az eredményeket a következő táblázat, illetve a 3. ábra tartalmazza.

T á b l á z a t

Faj	Sejtvonal	Inkubálás időtartalma (nap)	Sejtszám/tenyésztő edény (3 mmØ) 10 ⁻⁵ x sejt/edény	
			Kontroll	Limfotoxin
Ember	Hela	4	8,1	0,6
	Hep-2	3	9,3	2,1
	A-549	4	10	3,4
Majom	GL-V3	3	5,6	4,5
	Vero	3	6,3	5,3
Egér	L929	4	8,5	3,1
	IT22	3	13	4,0
	B16	4	19	4,9
Nyúl	RK13	3	4,6	3,5

A táblázatból, illetve ábrából látható, hogy az 1670 sejtek tenyésztéseinek felülúszói megtudják gátolni különböző fajok tumorsejtjeinek szaporodását. Ez a tulajdonság jellemző a limfotoxinokra [Evans, Cancer Immunol. Immunother., 12, 181-190 (1983)], s ez különbözteti meg ezt a csoportot azoktól a proteinektől — különösen az interferonoktól — amelyek ugyancsak gátolják a tumorsejtek növekedését, de általában fajspecifikusak és ezért különösen a humán interferon például, az egérsejtekre nagyon kevésbé vagy egyáltalán nem hat.

Az előbb felsorolt transzformált emberi T-limfocita sejtvonalak, valamint a (tumor-) sejtvonalak a szakirodalomból ismertek.

Az 1670 sejtvonalat 1984. március 28-án letétbe helyeztük I-294 letéti szám alatt a párizsi Pasteur Intézetben, a „Collection nationale de cultures de microorganismes (C.N.C.M.)“

gyűjteményben, az Európai Találmányi Egyezmény 28. szabálya értelmében.

2. példa

Limfocita termelés növelése diterpén vegyületekkel majom-T-limfocita sejtvonalakban

Sűrű tenyészeteket 1:2 — 1:3 arányban hígítunk friss tápoldattal, a következő napon még egyszer 1:3 arányban hígítunk és ugyanabból a törzstenyészetből 5 ml-eket osztunk el három edénybe. Hozzáadjuk a stimulátorokat (100 µg/ml töménységű törzsoldatok dimetilszulfoxidban) és a tenyészeteket három napig inkubáljuk. Ezután a sejteket centrifugálással távolítjuk el, a felületűszoikat lefagyasztjuk és -20° C-on tároljuk a limfotoxin teszteléséig.

Két daganat-keltő diterpént választottunk ki, a TPA-t és a mezereint és ezeknek a kiválasztott majom-T-limfocita sejtvonalak limfotoxin termelésére gyakorolt hatását mutatjuk be a következő táblázatban:

Sejtvonal	Kísérlet	Koncentráció (µg/ml)	A felülúszó limfotoxin aktivitása (RE/ml)		
			Kontroll	TPA	Mezerein
1670	1	20	83	520	270
	2	20	77	210	76
	3	100	88	340	370

3. példa

Limfotoxin termelés szérumentes tápoldatban

Szérum tartalmú tápoldatban történő szaporítás után (lásd a 2. példát) a sejteket szé-

rum-mentes tápoldatban visszük át.

A következő táblázatban az 1670 sejtek limfotoxin termelésének (lásd az 1. példát) összehasonlító adatait mutatjuk be szérum tartalmú és szérum-mentes tápoldatban, 20 ng/ml Mezerein jelenlétében:

Kísérlet	A tápoldat szérum tartalma (%)	Limfotoxin aktivitás (RE/ml)	Protein tartalom (mg/ml)	Specifikus aktivitás (RE/mg)
1	10	370	5	74
2	10	180	5	36
3	10	270	5	54
4	0	140	0,050	2.800
5	0	72	0,053	1.400
6	0	160	0,044	3.700

A protein meghatározásokat Bradford módszerével [Anal.Biochem., 72, 298 (1976)] végeztük.

4. példa

1670-sejtek által termelt limfotoxin koncentrációja és tisztítása PCG-oszlopkromatográfiával

1670 sejteket tenyésztünk 10% fetális borjúsérumot tartalmazó RPMI1640 tápoldatban, rázott Erlenmeyer lombikokban (1 literes lombikban 0,5 liter tenyészet; fordulatszám; 40/perc). A jól növekedő tenyészetekből a sejteket lecentrifugáljuk, mossuk és szérum-mentes, 20 ng/ml Mezerein tartalmú RPMI1640 tápoldatban reszuspendáljuk. A

szuszpenziót 150 cm²-es műanyag tenyésztő edényben (edényenként 200 ml) 3 napig állni hagyjuk, végül centrifugálással és szűréssel állítjuk elő a tenyészet felülúszóját.

Az ily módon kapott felülúszót 10 ml PCG-n kromatografáljuk (pórúsátmérő: 350Å; szemcsenagyság: 120-200 mesh; oszlop átmérő: 9 mm; átfolyási sebesség: 140 ml/óra). Az oszlopot ezután 10 ml 10% nátrium-foszfát pufferrel (pH = 7,2), amely nátrium-kloridra 1,5 mólos, mossuk, végül ugyanezen pufferrel — 50% etilén-glikol (térf./térf.) tartalommal — eluáljuk.

Két ilyen kísérlet eredményét tartalmazza a következő táblázat:

	Térfogat (ml)	Limfotoxin (RE/ml)	%	Protein (mg/ml)	Specifikus aktivitás (RE/mg)
<u>1. kísérlet</u>					
Minta	2.800	162	100	0,044	3.700
Átfolyás	2.800	13	8	-	-
Mosófrakció	10	96	1	-	-
Eluátum	20	17.300	76	2,0	8.650
<u>2. kísérlet</u>					
Minta	2.500	141	100	0,050	2.800
Eluátum	17	8.600	41	1,6	5.400

1
5. példaLimfotoxin-mRNS-aktivitás kimutatása 1670 és 1022 sejtek RNS-preparátumaiból

A sejteket 800 ml 10% fetális borjúsérumot tartalmazó tápoldatban szuszpendáljuk úgy, hogy a sejtek sűrűsége körülbelül 5×10^5 sejt/ml legyen, majd hozzáadunk ml-enként 20 ng mezerein-t. Húsz órával később a sejteket centrifugálással gyűjtjük össze, megfelelő pufferben (például 10 mM trisz-sósav (pH = 7,4), 140 mM nátrium-klorid és 1,5 mM magnézium-klorid tartalmú puffer) mossuk és 10 ml Lyse-pufferben [például 10 mM trisz-sósav (pH = 8,4), 140 mM nátrium-klorid, 1,5 mM magnézium-klorid és 0,5% Nonidet-P 40 (nem ionos detergens, a Shell cég márkanevével) tartalmú puffer] szuszpendáljuk. A szuszpenziót 10 percig inkubáljuk jégfürdőben, majd rövid ideig rázzuk és a sejtmagokat centrifugálással távolítjuk el.

2

A centrifugálás után kapott felülúszóból (= citoplazma) ismert eljárással — például fenolos extrahálással [Aviv és munkatársai, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 69, 1408-1412 (1977)] — izoláljuk az RNS-t. Az izolált RNS-t vízben oldjuk (koncentrációja körülbelül 3-5 mg/ml) és ismert eljárással *Xenopus laevis* oocitákban transzlatáljuk [például: Colman és munkatársai, Cell, 17, 517-526 (1979); Hitchcock és munkatársai, Anal.Biochem., 109, 338-344 (1980); Contreras és munkatársai, Anal.Biochem., 113, 185-187 (1981)]. A transzlációs termékek limfotoxin aktivitását biológiai módszerrel vizsgáljuk.

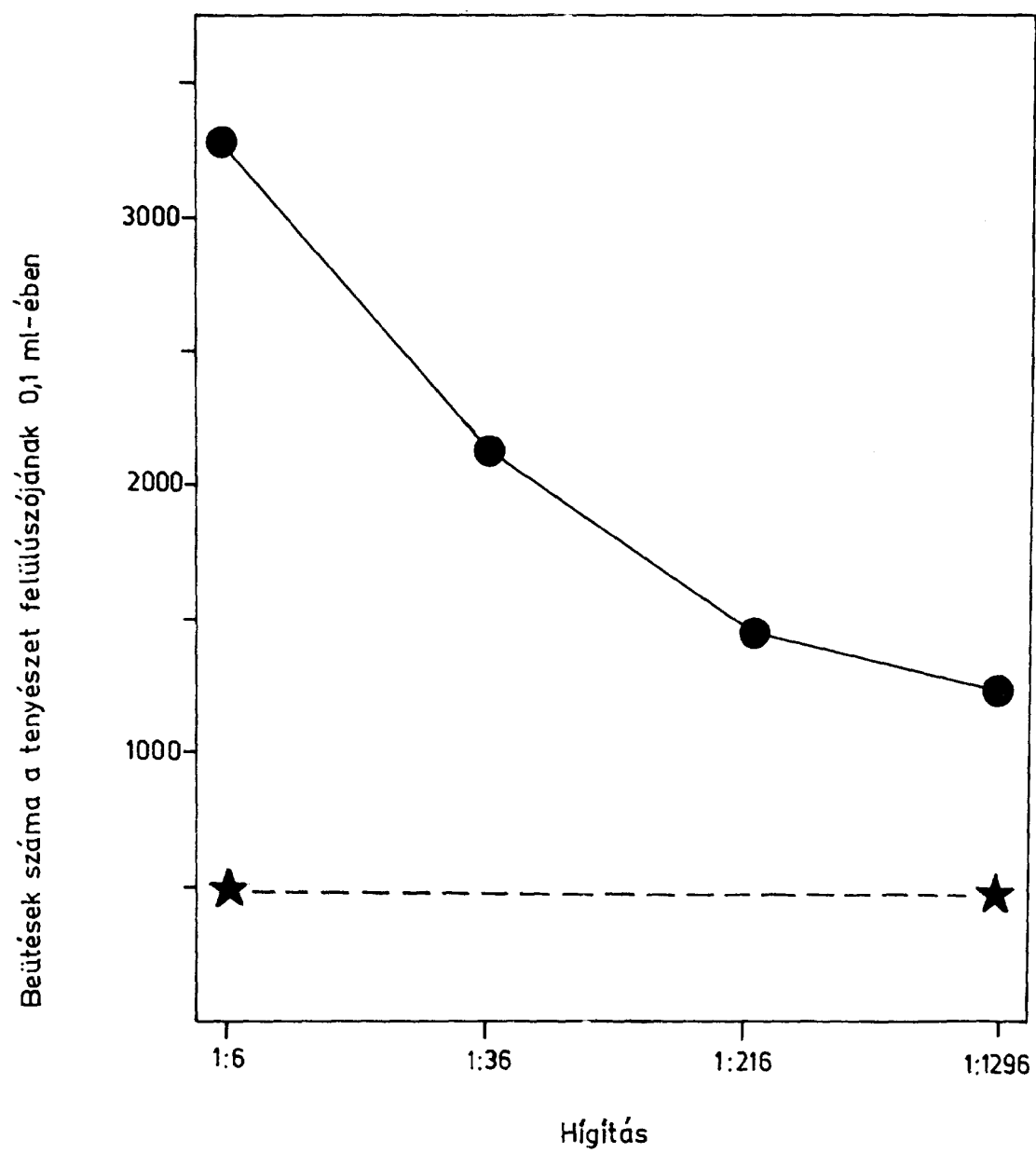
A következő táblázatban az oocita felülúszókban mért citotoxikus aktivitást mutatjuk be, összehasonlítva a MOLT-4 sejtek — humán-T-limfocita-sejtvonal, melynek tenyésztésében nincs kimutatható limfotoxin aktivitás — RNS preparátumaival és a kezeletlen oocita felülúszókkal:

Preparátum	A felülúszó radioaktivitása (cpm/100 μ l) Az oocita felülúszók hígítása			
	1 : 12	1 : 42	1 : 147	1 : 514
Kontrollok (nem oltott oociták)	2.200	2.300	2.100	2.500
	2.400	2.200	1.800	3.000
MOLT-4 RNS 1. kísérlet	1.600	2.400	1.700	2.200
2. kísérlet	1.700	2.300	1.600	1.800
1670-RNS 1. kísérlet	4.700	4.700	3.600	2.800
2. kísérlet	4.300	3.800	3.300	2.600
3. kísérlet	3.200	2.800	2.800	
Kontrollok	4.400	3.300	-	-
1670-RNS 1. kísérlet	6.100	5.000	-	-
2. kísérlet	6.600	5.100	-	-
			-	-

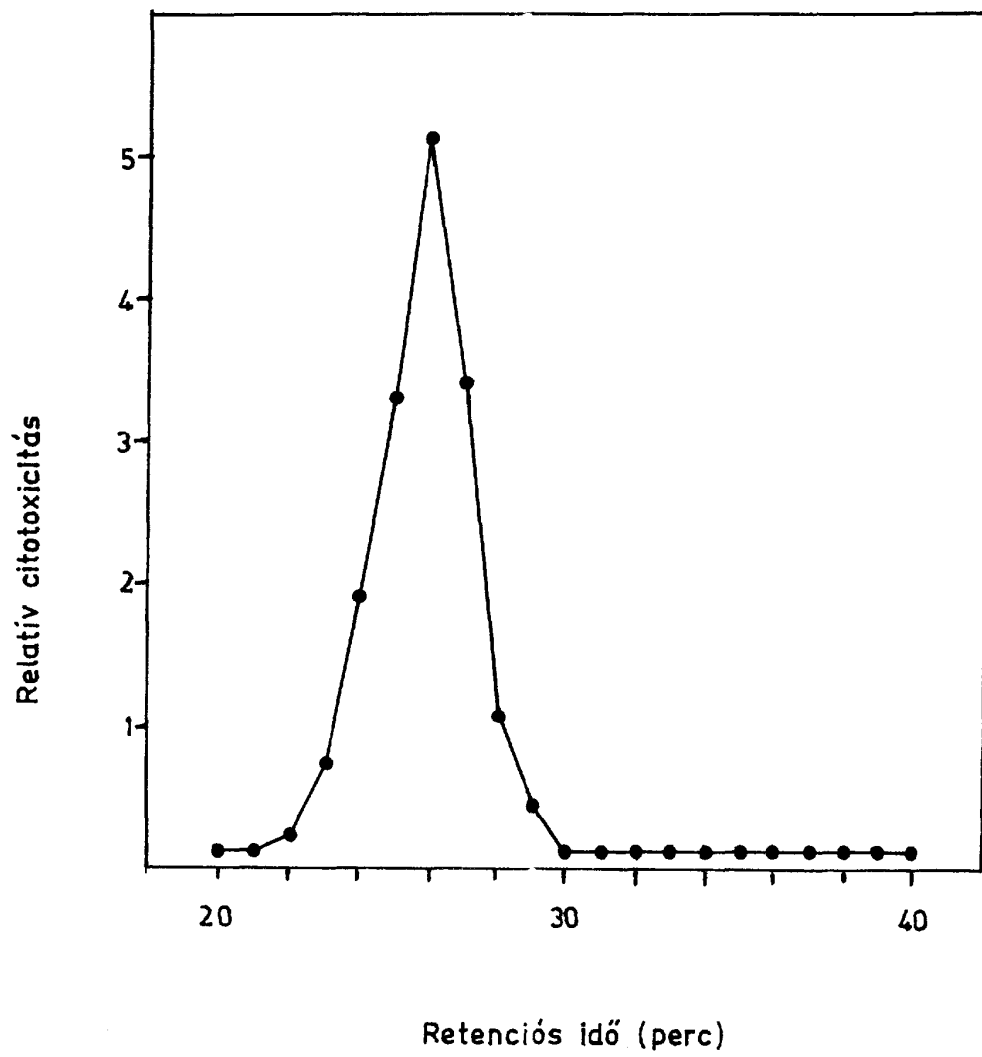
A táblázatból látható, hogy mindhárom 1670 sejt-RNS preparátum szignifikánsan növeli a felszabaduló radioaktivitást, egészen a 147-szeres hígításig, míg a MOLT-4 sejtek ilyen aktivitást nem mutatnak. Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy az 1670 sejtek biológiailag aktív limfotoxin-mRNS-t tartalmaznak.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

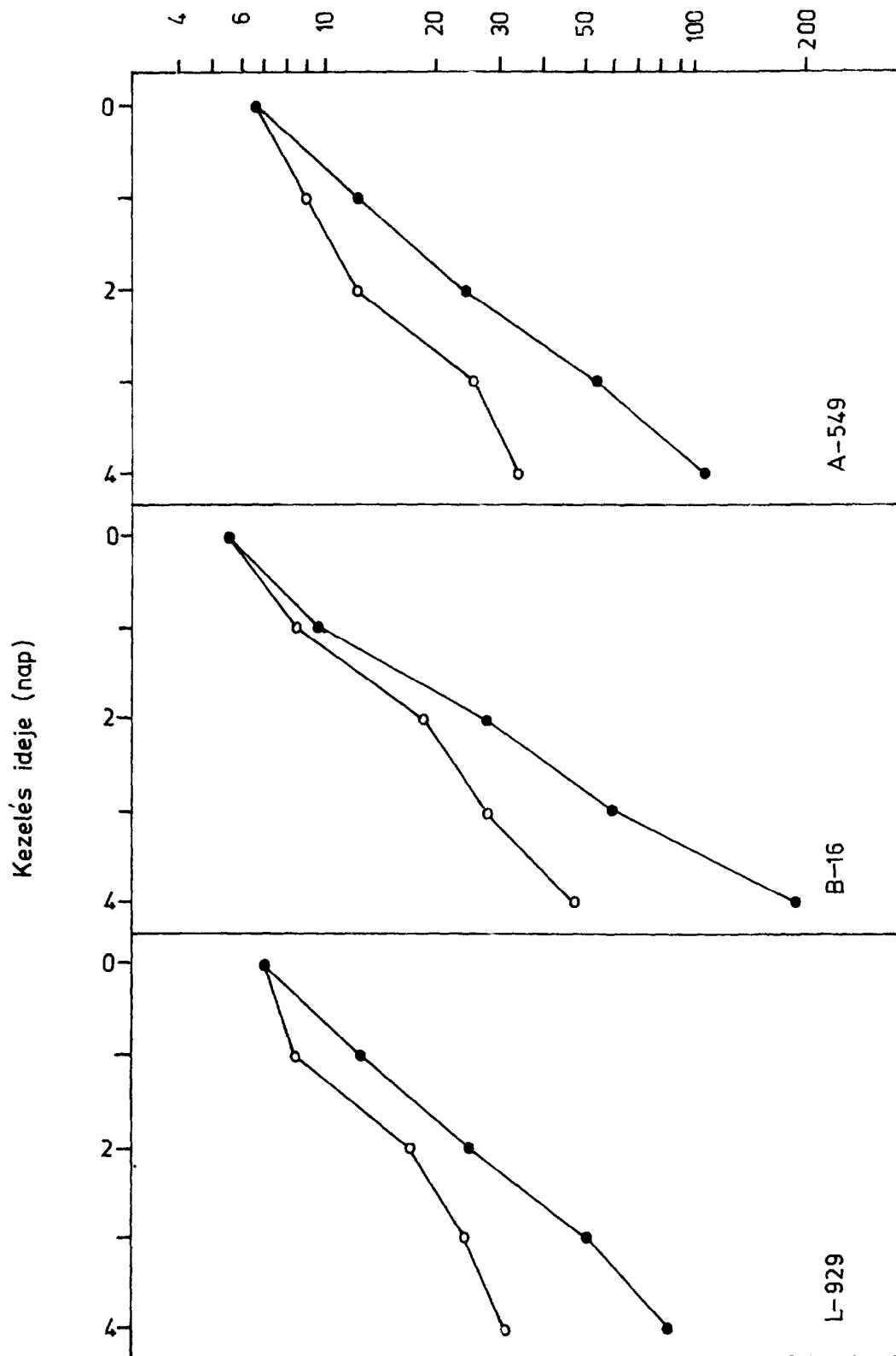
1. Eljárás limfotoxin vagy limfotoxin-mRNS előállítására azzal jellemezve, hogy herpes vírussal transzformált majom-T-limfocita 1670 sejtvonalat megfelelő tápoldatban folyamatos tenyésztésben szaporítunk és a limfot-



1. ábra



2. ábra

10^{-4} sejt / edény

3. ábra

Kiadja: Országos Tisztasági Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Himer Zoltán osztályvezető

Nr. 2244, Nyomdaipari vállalat, Úzsgorod