

CZ 283 148 B6

283 148

C 07 K	14/00
C 07 K	16/00
C 07 K	1/00
C 07 K	17/00
C 12 P	21/08

Lymfotoxin obsahuje sekvenci aminokyselinových zbytků 24 až 171 na obrázku 2A a není glykosylován nebo má variantní glykosylaci při srovnání s odpovídajícím přírodním lymfotoxinem z lidských lymfoidních buněk. Protilátka neutralizuje cytolytickou aktivitu lymfotoxinu a neobsahuje neneutralizující protilátky. Nukleová kyselina kóduje definovaný lymfotoxin a obsahuje DNA, která neobsahuje intron, přítomný mezi nukleotidy 284 a 285 a je to s výhodou cDNA. Replikovatelný vektor obsahuje uvedenou nukleovou kyselinu. Heterologní buňka je transformována shora definovanou nukleovou kyselinou.

[illegible]

Izolovaný biologicky aktivní lymfotoxin, jeho protilátka, nukleová kyselina, kódující tento lymfotoxin, a další látky jej obsahující

5 Oblast techniky

Vynález se týká izolovaného biologicky aktivního lymfotoxinu, jeho protilátky, nukleové kyseliny, kódující tento lymfotoxin, a dalších látek jej obsahujících.

10

Dosavadní stav techniky

Lymfotoxin byl poprvé identifikován jako biologický faktor s protibuněčnou účinností na neoplastické (novotvarové) buněčné linie. Účinnost, která se popisuje jako lymfotoxinová, která se získává z lymfocytů stimulovaných mitogenem, je spojena se spektrem cytotoxických účinností od cytostázy jistých nádorových buněčných linií do význačné cytolýzy jiných transformovaných buněk. Lymfotoxinová účinnost je však charakterizována malou nebo žádnou protibuněčnou účinností na primární buněčné kultury a testované normální buněčné linie. Tato údajná diskriminační vlastnost lymfotoxinu vedla k in vivo studiím, z nichž vyplývá, že lymfotoxin může mít potenciální protinádorovou účinnost.

Lymfotoxin je termín, který se používá k popisu celé skupiny molekul. Lymfotoxinové molekuly byly identifikovány jako glykoproteiny, které se dělí na pět tříd podle molekulových hmotností, z nichž každá je dále ještě heterogenní, pokud jde o náboj. Zdá se, že ve většině lymfocytových supernatantů převládají lidská alfa (molekulová hmotnost 70 000 až 90 000) a lidská beta třída (molekulová hmotnost 25 000 až 50 000). Alfa třídy (podle molekulové hmotnosti) se podle náboje dělí do alespoň sedmi podtříd, zatímco beta třídy se dělí na dvě různé podtřídy (G. Granger a spol. v "Cellular Responses to Molecular Modulators", str. 287 až 310, ed. Mozes a spol., 1981). Byly identifikovány také komplexní (o molekulové hmotnosti větší než 200 000) a gama (molekulová hmotnost 10 000 až 20 000) formy lymfotoxinu. Různé formy a třídy lymfotoxinu se mezi sebou liší ve stabilitě a v kinetice jejich vzniku v kultuře. Při nízké iontové síle se mohou agregovat spolu s komplexní třídou. Třídy lymfotoxinů o nižší molekulové hmotnosti byly popsány jako relativně nestálé a slabě buněčně lytické při srovnání s třídami o vyšší molekulové hmotnosti [Hiserodt a spol.: Cell. Immun. 26, 211 (1976), Granger a spol. v "Biochemical Characterisation of Lymphokines", 279 až 283, ed. De Weck a spol., 1980.]. Aktivita gama třídy nebyla pro svoji nestabilitu extenzivně studována [G. Granger a spol.: Cellular Immunology 38, 388 až 402 (1978).]. Rovněž beta třída je v literatuře popsána jako nestabilní [Walker a spol.: J. Immunol. 116(3), 807 až 815 (březen 1976).].

Je třeba si uvědomit, že lymfokinová terminologie není jednotná. V současné době názvy, které jsou dávány produktům buněčných kultur, jsou většinou funkcí buněk, o nichž se předpokládá, že vyrábějí produkt a vytvářejí produkty v biologických zkouškách. Tyto produkty jsou však ve velkém měřítku chatrně charakterizovány. Příčin je několik: mnohé studie byly prováděny s částečně čistými preparáty, testy, které byly použity k charakterizování produktů, nejsou molekulárně specifické a v některých případech probíhají za značných obměn. Opravdová identita různých cytotoxických faktorů zůstane neznámá, pokud nebude existovat standardní terminologie, založená na zřetelně testovatelných rozlišujících vlastnostech, jako jsou například sekvence aminokyselin nebo imunní epitopy. Příklady dalších názvů, které jsou dávány produktům cytotoxické buněčné kultury, jsou nádorový nekrotický faktor, NK buněčný cytotoxický faktor, hemoragický nekrotický faktor a makrofágový cytotoxinový nebo cytotoxický faktor.

USA patentová přihláška č. 608 316 (podána 7. května 1984) a evropský patent 100 641 A (publikovaný 15. února 1984) popisují aminokyselinové sekvence lidského lymfotoxinu, který

byl izolován z lidské lymfoblastoidní buněčné linie RPMI-1788. Hayashi a spol. v evropském patentu 132 125 A (publikovaném 23. ledna 1985) popisují izolaci proteinu z králíka po stimulaci jeho retikuloendoteliálního systému. Bylo popsáno, že protein má protinádorovou účinnost a jeho N-terminální aminokyselinové sekvence je 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-Trp-Leu. Doprovázející USA patentová přihláška 628 059 (podáno 5. července 1984) popisuje čištění a rekombinantní syntézu cytotoxického lidského polypeptidu, který byl identifikován jako nádorový nekrozový faktor s N-terminální aminokyselinovou sekvencí: Val-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Thr-Pro-Ser-Asp-Lys-Pro-Val-Ala-His-Val-Val-Ala-Asn-Pro. Ohnishi a spol. (USA patent 4 481 137) popisují získání látky o molekulové hmotnosti 7 000 až 9 000, kterou pojmenovali CB_{x3}, z kultury buněk BALL-1. Tato látka potlačuje růst nádorových buněk a má N-terminus Ala-Ala.

Podle Totha a Grangera [Mol. Immun. 16, 671 až 679 (1979).] ani odstranění sialové kyseliny z lymfotoxin-obsahujících lymfocytových supernatantů neuramidazovým zpracováním, ani přidání N-acetyl-glukosaminu, galaktózy, laktózy, manózy, α -methylmanosidu nebo fukózy k supernatantům nemá žádný vliv na in vitro lytickou aktivitu. Toth a spol. tudíž z toho vyvodili, že jednoduché cukry nehrají roli v účinnosti jejich lymfotoxinu. Toth a spol. však také pozorují, že sacharidy hrají důležitou roli při působení jiným lymfokinů. Z toho vyvozují závěr, že nemohou vyloučit participaci složitějších forem oligosacharidů v cytotoxické aktivitě lymfotoxinů.

Proctor, Klostergaard a Granger [Clinical Research 30(1), 55A (1982).] uvádějí, že lidské lymfocyty, jestliže jsou aktivovány PHA za přítomnosti tunikamycinu (k inhibici adice N-navázaných cukerných zbytků na lymfotoxinové molekuly), uvolňují biologicky inertní lymfotoxin. Podle těchto autorů imunochemické studie odhalily, že zatímco cukerný zbytek lymfotoxinu nebyl potřeba pro jeho transport nebo pro uvolnění aktivovaného lymfocytu v supernatantu, byl cukr potřeba pro efektivní destrukci cílových buněk, protože cukr byl odpovědný za příslušnou konformaci molekul (molekuly) lymfotoxinu.

Další literatura, kterou by bylo možno prostudovat v souvislosti s touto přihláškou, zahrnuje: Evans: Cancer Immunol. Immunother. 12, 181 až 190 (1982), Lee a spol.: Cell. Immun. 48, 166 až 181 (1979), De Weck a spol. (ed.): Biochemical Characterization of Lymphokines", str. 279 až 312 (1980), Khan a spol. (ed.): Human Lymphokines, str. 459 až 477 (30. června 1982), Aggarwal a spol.: příspěvek na 3rd International Lymphokine workshop in Haverford, Pa., 1. až 5. září 1982, Ransom a spol.: Cancer Research 43, 5222 až 5227 (listopad 1983), Kull a spol.: J. of Immun. 126(4), 1279 až 1283 (duben 1981), J. Sawada a spol.: Jap. J. Exp. Med. 46, 263 až 267 (1976), G. Granger a spol.: Cell Immun. 38, 388 až 402 (1978), J. Rundell a spol.: Immunopharmacology 3, 9 až 18 (1981), G. Granger a spol.: J. Lymphokine Res. 1, 45 až 49 (1982), N. Ruddke a spol.: Lymphokine Res. 2, 23 až 31 (1983), M. Mitsuhashi a spol.: Britská patentová přihláška 2 106 117, H. Enomoto: Evropská patentová přihláška 87 087A, B. Williamson a spol.: P.N.A.S. USA" 80, 5397 až 5401 (1983) a S. Wright a spol.: J. Immun. 126, 1516 až 1521 (1981).

Lymfotoxiny (nebo látky identifikované jako lymfotoxin), získávané zde z lymfocytové kultury, jsou přítomny v nízkých koncentracích, řádově 0,05 až 2.10⁶ jednotek na litr supernatantu buněk RPMI-1788 nebo primárních lymfocytů. Získané množství je často značně proměnlivé a primární lymfocyty jsou drahé. Je tedy zapotřebí ekonomický způsob výroby lymfotoxinu [Yamato a spol.: J. of Biological Response Modifiers 3(1), 76 až 87 (1984).].

Podle předcházejících způsobů se nepodařilo vyrobit lymfotoxin, který je homogenní v aminokyselinové sekvenci, což je důležitá vlastnost pro použití jako léčivo. Lymfotoxin, který se izoluje z kultury buněčných linií, vykazuje heterogenitu na aminovém konci, možná díky

proteolytické procesi (viz shora citovanou USA přihlášku 608 316). Kultury primárních lymfocytů, např. z nosních mandlí nebo periferní krve, musí nutně obsahovat buňky mnoha donorů z důvodů ekonomických. Produkty těchto buněk budou však ovlivněny genetickou růzností mezi donory, takže výsledný "lymfotoxin" může být ve skutečnosti směsí alelických typů. Podíly a identity takových alel budou jeden od druhého zřejmě neznámé. Je tedy potřebný způsob výroby lymfotoxinu, který by byl jednotný, pokud jde o jeho aminokyselinovou sekvenci.

Předchozí způsoby jsou omezeny také tím, že se podle nich produkuje lymfotoxin, který má primární aminokyselinové sekvence odpovídající lymfotoxinům, které se nacházejí v přírodě. Substituce (náhrada), delece (vynechání) nebo inserce (vlození) různých aminokyselin do těchto sekvencí by vyžadovaly rozsáhlé a nákladné chemické modifikace, pokud by se těchto modifikací vůbec dosáhlo. Jsou tedy zapotřebí způsoby, kterými by se snadno dosáhlo různých změn aminokyselinových sekvencí lymfotoxinu.

Ačkoliv protinádorové účinky a zřejmá terapeutická hodnota lymfotoxinové aktivity je v literatuře popisována od roku 1968, lymfotoxin nebyl studován v extenzivních klinických protokolech nebo uveden na trh vzhledem k malým množstvím a heterogenní povaze lymfotoxinu, dostupného podle předcházejících způsobů. Jsou tedy zapotřebí způsoby, podle kterých by se ekonomicky vyráběla taková množství lymfotoxinu, kterých je zapotřebí pro klinické studie.

V literatuře je popsáno králičí antisérum, které je schopné neutralizovat cytolytickou aktivitu různých cytotoxinů včetně látek, které byly identifikovány jako lymfotoxin [Yamato a spol.: Cell. Immun. 38, 403 až 416 (1978), Gately a spol.: Cell. Immun. 27, 82 až 93 (1976), Hiserodt a spol.: J. Immun. 119(2), 274 až 380 (1977), Zacharchuk a spol.: P.N.A.S. USA 80, 6341 až 6345 (říjen 1983), Ruddle a spol.: Lymphokine Research 2(1), 23 až 31 (1983), Mannel a spol.: Infection and Immunity 33(1), 156 až 164 (1981), Wallach a spol.: The Biology of the Interferon System", ed. E. De Maeyer a spol., str. 293 až 302 (publikováno v září 1983) a Stone-Wolff a spol.: J. Exp. Med. 159, 828 až 843 (březen 1984). Jelikož je toto antisérum polyklonální, obsahuje různé protilátky proti imunogenu lymfotoxinu. Kterákoliv nebo kterékoliv z těchto protilátek způsobují neutralizaci "lymfotoxinové účinnosti". Sdělení v literatuře jsou obvykle nejasná, pokud jde o molekulární identitu látky, zodpovědné za lymfotoxinovou účinnost, která byla použita jako imunogen. To, co je pro diagnózu a imunoafinitní čisticí postupy potřeba, je monospecifická protilátka proti jasně a jednoznačně identifikované lymfotoxinové molekule.

Podstata vynálezu

Jedním předmětem vynálezu je izolovaný biologicky aktivní lymfotoxin, který obsahuje sekvenci aminokyselinových zbytků 24 až 171 na obrázku 2a, který není glykosylován nebo má variantní glykosylaci při srovnání s odpovídajícím lymfotoxinem z lidských lymfoidních buněk.

Izolovaný biologicky aktivní lymfotoxin obsahuje s výhodou sekvenci s aminokyselinovými zbytky 1 až 171 na obrázku 1.

Specifická aktivita izolovaného biologicky aktivního lymfotoxinu je v rozsahu od 2 do $10 \cdot 10^8$ jednotek na mg proteinu.

Druhým předmětem tohoto vynálezu je protilátka, která neutralizuje cytolytickou aktivitu lymfotoxinu a neobsahuje neneutralizující protilátky.

Protilátka je s výhodou monoklonální protilátka a je popřípadě značena detekovatelnou látkou. Detekovatelná látka znamená fluorescenční, chemiluminiscenční nebo radioisotopovou značku. Protilátka může být imobilizována na povrchu nebo na matici.

Třetím předmětem vynálezu je nukleová kyselina kódující shora definovaný lymfotoxin. Nukleová kyselina s výhodou obsahuje DNA, která neobsahuje intron, přítomný mezi nukleotidy 284 a 285. Nukleovou kyselinou je výhodně cDNA.

5

Nukleová kyselina může být kovalentně označena detekovatelnou látkou.

Čtvrtým předmětem vynálezu je replikovatelný vektor, který obsahuje shora uvedenou nukleovou kyselinu. Je výhodné, je-li vektor replikovatelný v prokaryotech nebo eukaryotech.

10

Vektor, replikovatelný v prokaryotech, s výhodou obsahuje bakteriální promotor, odštěpitelně napojený na nukleovou kyselinu, kódující lymfotoxin. Je výhodné, kóduje-li nukleová kyselina v replikovaném vektoru napojení bakteriálního sekrečního leaderu a lymfotoxinu.

15

Výhodný replikovatelný vektor znamená pLTrpl nebo p20KLT.

Pátým předmětem vynálezu je heterologní buňka, transformovaná shora definovanou nukleovou kyselinou. Heterologní buňka může být s výhodou transformována shora uvedeným replikovatelným vektorem. Buňkou je s výhodou prokaryot.

20

Šestým a posledním předmětem tohoto vynálezu je izolovaný biologicky aktivní variantní lymfotoxin, v němž aminokyselinový zbytek v lymfotoxinové sekvenci podle obrázku 2a je a) vynechán, b) nahrazen jiným zbytkem nebo c) do sekvence podle obrázku 2a je vložen jiný zbytek s tím, že z tohoto variantního lymfotoxinu je vyloučen lymfotoxin, který má sekvenci podle obrázku 2a s aminovými konci na Leu+1 nebo His+24. Zbytky -34 až -1 mohou být vynechány v izolovaném biologicky aktivním variantním lymfotoxinu, který dále může obsahovat inserci alespoň jednoho aminokyselinového zbytku. Inzerce znamená s výhodou spojení polypeptidu s karboxylovým koncem lymfotoxinu.

25

30

V izolovaném biologicky aktivním variantním lymfotoxinu může být polypeptid napojen na lymfotoxin místem hydrolýzy proteolytickým enzymem. Variantní lymfotoxin může být s výhodou cytolyticky neaktivní před proteolytickou hydrolýzou.

35

Variantní lymfotoxin obsahuje s výhodou náhradu jednoho aminokyselinového zbytku nebo delecí od 1 do 30 aminokyselinových zbytků, nebo inserci jednoho aminokyselinového zbytku. Náhrada znamená náhradu zbytku ze skupiny neutrálních nebo bázičských aminokyselinových zbytků takovým zbytkem, který není členem skupiny, do které patří nahrazená aminokyselina.

Variantní lymfotoxin může být cytotoxický.

40

Uvedených cílů tohoto vynálezu bylo dosaženo úspěšnou rekombinantní expresí proteinu, který má lymfotoxinovou účinnost. Tento typ lymfotoxinu, který je zde popsán v termínech jeho účinnosti a přirozené nebo obměněné aminokyselinové sekvence, je zde dále označován jako lymfotoxin. Dna kódující lymfotoxin byly překvapivě identifikovány přes nepatrné hladiny lymfotoxinu, expresované v homologních buňkách a přes nejistotu v čase, ve kterém se messenger-RNA (mRNA) kódující lymfotoxin objevuje v homologních buňkách. Překvapující bylo také to, že biologicky aktivní lymfotoxin je expresován v rekombinantních buňkách, které neglykosylují lymfotoxin (nebo u kterých se to neočekává tak jako u homologních buněk). Lymfotoxin, který se touto expresí získá, má v podstatě jednotnou aminokyselinovou sekvenci, bez N-terminální enzymatické hydrolýzy. V buněčné kultuře dochází k expresi DNA kódující lymfotoxin v takovém počtu kopií, který převyšuje 0,1 až $1 \cdot 10^{11}$ jednotek na litr lyzátu kultury.

50

Lymfotoxin, který je rekombinantní hostitelskou buňkou expresován, závisí na DNA, která byla použita ke kódování lymfotoxinu nebo jeho prekurzorů, a také na vybrané hostitelské buňce.

- Nukleokyselinové sekvence, které jsou zde použity pro syntézu lymfotoxinu, jsou nové. Jsou charakterizovány nukleotidovými sekvencemi, které se liší od původní nebo přírodní sekvence v jedné nebo ve více následujících možnostech: DNA neobsahuje introny, v případě lidského lymfotoxinu je intron přítomný mezi nukleotidy 284 a 285 (obrázek 2a). DNA neobsahuje nukleovou kyselinu, kódující jiné proteiny organismu, z něhož DNA pochází; nukleová kyselina, kódující lymfotoxin, je ligována do vektoru; a/nebo nukleová kyselina je schopná hybridizace na nukleovou kyselinu kódující lymfotoxin, avšak s tím, že taková hybridizovaná nukleová kyselina nemá nukleotidovou sekvenci přírodní DNA nebo RNA kódující lymfotoxin.
- Mutantní nukleové kyseliny, kódující lymfotoxin, jsou produktem rekombinantních manipulací. K tiché mutaci v 5' netranslované oblasti dochází proto, aby se zvýšila hladina exprese ve vybraných hostitelích, např. redukcí možnosti struktur m-RNA se spárovanými úseky a nespárovanými (smyčkami) úseky [stem and loop] v 5' oblastech nukleové kyseliny, nebo substitucí hostitelem preferovaných kodónů, nalezených v přírodních nukleokyselinových izolátech.
- Spíše než tiché mutace umožňují mutace v nukleových kyselinách, které jsou represovány, přípravu lymfotoxinů, které mají aminokyselinovou sekvenci původního lymfotoxinu nebo primární sekvenci jeho variant s aminokyselinovými sekvencemi, lišícími se od původního lymfotoxinu. Mutantní lymfotoxin se izoluje jako takový, nebo je dále procesován hostitelskou buňkou, takže se získá žádaný typ lymfotoxinu. Tyto nukleové kyseliny nebo nukleové kyseliny, které se s nimi hybridizují, nebo jejich fragmenty, se označí a použijí se v hybridizačních testech při identifikaci nebo určování genetického materiálu, kódujícího lymfotoxin.
- Při syntéze lymfotoxinu se DNA, která kóduje lymfotoxin, liguje do vektoru, vektor se použije pro transformaci hostitelských buněk, hostitelské buňky se kultivují a lymfotoxin se izoluje z kultury. Tento obecný postup se používá pro syntézu lymfotoxinu s aminokyselinovou sekvencí původního lymfotoxinu, nebo pro konstrukci nových lymfotoxinových variant podle konstrukce vektoru a podle hostitelské buňky, vybrané pro transformaci. Typy lymfotoxinů, které jsou schopné syntézy, zahrnují lymfotoxin s leucylovou skupinou na aminovém konci, lymfotoxin s histidylovou skupinou na aminovém konci, pre-lymfotoxin a lymfotoxinové varianty, mezi něž patří a) kondenzované proteiny, v nichž heterologní protein nebo polypeptid je vázán peptidovou vazbou na aminový a/nebo karboxylový konec aminokyselin lymfotoxinu, b) lymfotoxinové fragmenty, zvláště fragmenty pre-lymfotoxinu, v němž kterákoliv aminokyselina mezi -34 a +23 znamená aminokyselinu aminového konce fragmentu, c) lymfotoxinové mutanty, v nichž je jeden nebo více aminokyselinových částí substituováno, vloženo nebo vynecháno, d) deriváty s methionylovou skupinou nebo s modifikovanou methionylovou skupinou (jako je například formylmethionyllová skupina nebo jiné blokové methionylové skupiny) na aminovém konci, a/nebo e) neglykosylované nebo různě glykosylované typy všech předcházejících možností.
- Jestliže savčí buňka je transformována nukleovou kyselinou, kódující lymfotoxin, která je odštěpitelně ligována na eukaryotický sekreční leader (signál) (včetně sekrečního signálu původního lymfotoxinu), nebo jestliže nukleová kyselina, která kóduje lymfotoxin, je odštěpitelně ligována ve vektoru na prokaryotický nebo kvasinkový sekreční signál (leader), který je rozeznáván hostitelskou buňkou tak, že může být transformován (obvykle organismus, z něhož byla signální sekvence získána), hostitel se vektorem transformuje, kultivuje a pak se lymfotoxiny s methionylovým aminovým koncem izolují z kultury obvyklým způsobem.
- Jestliže DNA, kódující lymfotoxin, je odštěpitelně ligována do vektoru bez sekreční signální sekvence a potom je použita pro transformaci hostitelské buňky, pak syntetizované lymfotoxiny jsou na aminovém konci obvykle substituovány methionylovou skupinou nebo modifikovanou methionylovou skupinou, jako je například formylmethionyllová skupina.
- Byly získány postupy, podle nichž in vitro mutagenese nukleové kyseliny, která kóduje lymfotoxin, vede k expresi lymfotoxinových variant dříve nedostupných. Nejdříve dojde

k expresi lymfotoxinu s methionylovou skupinou nebo s modifikovanou methionylovou skupinou na N-konci hostitelskou buňkou, transformovanou nukleovou kyselinou, kódující lymfotoxin, který je přímo expresován, tj. který není odštěpitelně vázán na sekreční signální sekvenci. Potom se po zavedení delece, substituce a/nebo inserce do nukleové kyseliny, která kóduje lymfotoxin, použije in vitro, místně specifická, předem stanovená nebo náhodná mutagenese. Tyto lymfotoxinové deriváty, získané expresí mutantní nukleové kyseliny, mají modifikované vlastnosti. A konečně se získávají nové typy lymfotoxinu jako neglykosylované nebo různé glykosylované lymfotoxiny. Neglykosylovaný lymfotoxin se vyrábí prokaryotickou expresí DNA, kódující lymfotoxin. Různé glykosylované typy lymfotoxinu jsou produktem rekombinantní kultury v transformovaných vyšších eukaryotických, obvykle savčích, buňkách.

Lymfotoxin, který se zde vyrábí, se vyčistí od kultivačních supernatantů nebo lyzátů imunoafinitní adsorpcí pomocí nesolubilizované lymfotoxin-neutralizující protilátky. Tato protilátka, která se nejefektivněji získává v monoklonální buněčné kultuře, vzniká v myších imunizací lymfotoxinu adsorbovaného na kamenci (síranu hlinitodraselném).

Pro terapeutické použití se lymfotoxin podle tohoto vynálezu používá v kombinaci s fyziologicky neškodnými stabilizátory a excipienty. Přípravuje se ve sterilních dávkových formách, jako například lyofilizací, v dávkových nádobkách, nebo se skladuje ve stabilizovaných vodných prostředcích. Pro implantaci do nádoru nebo do míst, z nichž byl nádor chirurgicky odstraněn, se používá lymfotoxin, obsažený v polymerní matrici. Tím se získá prostředek, který časem uvolňuje lymfotoxin, při čemž lymfotoxin je v daném místě lokalizován ve vysoké gradientové koncentraci. Terapeutické prostředky podle tohoto vynálezu se používají v terapeuticky efektivních dávkách implantačně, injekčně nebo infuzně živočichům, zvláště lidským pacientům, s maligními nádory.

Obrázek 1a ukazuje DNA sekvenci a aminokyselinovou sekvenci, která se obecně pokládá za sekvenci, kódující lymfotoxinový fragment. Na obrázku 1b je konstrukce syntetické DNA, kódující fragment na obrázku 1a. Obrázek 2a ukazuje úplnou aminokyselinovou sekvenci pro pre-lymfotoxin a její kódující DNA plus 5' a 3' sousedící netranslované oblasti. Obrázek 2b ilustruje způsob konstrukce expresního vektoru lymfotoxinu s methionylovou a leucylovou skupinou na aminovém konci a jeho deriváty s methionylovou skupinou na aminovém konci. Obrázek 3 ukazuje způsob konstrukce expresního vektoru pro lymfotoxin s methionylovou a histidylovou skupinou na aminovém konci. Obrázek 4 popisuje aminokyselinové sekvence lidského, myšího a hovězího lymfotoxinu a souhlasné části savčího lymfotoxinu. Obrázek 5a a obrázek 5b popisují konstrukci plazmidu, kódujícího spojení lymfotoxinu s bakteriální signální sekvencí.

Lymfotoxin je pro účely této přihlášky definován jako biologicky aktivní polypeptid, který má oblast, představující podstatnou strukturní aminokyselinovou homologii salespoň částí aminokyselinové sekvence lymfotoxinu, uvedené na obrázku 2a. Biologická účinnost je definována jako preferenční cytotoxická účinnost dále definovaná, imunologická zkřížená reaktivita s cytotoxickým lymfotoxinem nebo schopnost soutěžit s cytotoxickým lymfotoxinem o lymfotoxinové buněčné povrchové receptory. V posledních dvou příkladech nemusí být lymfotoxin cytotoxický sám o sobě. Imunologicky zkřížené mutanty jsou užitečné jako imunogeny pro zvýšení anti-lymfotoxinu u zvířat, např. při přípravě činidel pro imunotesty, zatímco necytotoxické kompetitivní mutanty nacházejí použití jako značená reakční činidla v imunotestech kompetitivního typu pro biologicky aktivní lymfotoxin.

Preferenční cytotoxická účinnost je definována jako preferenční destrukce nebo inhibice růstu nádorových buněk in vivo nebo in vitro při srovnání s normálními buňkami za stejných podmínek. Destrukce nádorových buněk lyzí in vitro nebo nekrózou in vivo je výhodným konečným bodem testu, i když je možno uspokojivě použít také cytostatické nebo antiproliferační vlastnosti. Vhodné testy pro detekci protibuněčných účinností lymfotoxinu jsou

popsány v následujících citacích: B. Aggarwal a spol.: J. Biol. Chem. 259(1), 686 až 691 (1984) a E. Carswell a spol: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 3666 až 3670 (1975).

5 Lymfotoxinová specifická účinnost je zde definována spíše v termínech lyze cílové buňky než cytostáze. Jedna jednotka lymfotoxinu je definována jako množství, kterého je potřeba pro 50% lyzi buněk, umístěných v každé jamce, jak bude dále popsáno v příkladu 1. Lze však použít i jiné způsoby stanovování cytotoxické účinnosti.

10 Pod pojmem podstatná strukturní homologie se obvykle míní, že více než asi 60 procent, obvykle více než 70 procent aminokyselinových zbytků v polypeptidu je shodných nebo zachovávají substituce odpovídajícím (odpovídajícími) zbytkem (zbytky) v sekvenci na obrázku 2a. Ne všechny sekvence lymfotoxinového polypeptidu potřebují být homologní se sekvencí na obrázku 2a. Je pouze třeba, aby byla s nějakou částí sekvence na obrázku 2a homologní pouze tak dlouhá část lymfotoxinového polypeptidu, aby získaný kandidát vykazoval požadovanou biologickou
15 účinnost. Obvykle by homologie měla existovat pro oblasti od asi 20 do 100 aminokyselinových zbytků s tím, že pro maximální homologii může být zapotřebí zavést případné díry. Jestliže oblast homologní se sekvencí na obrázku 2a není některou z klíčových oblastí lymfotoxinu, tj. oblastí důležitou pro cytotoxickou účinnost, pak je pro polypeptid (aby ještě byl zahrnut v definici) požadována menší homologie. Za klíčové oblasti sekvence na obrázku 2a jsou
20 považovány asi zbytky 162 až 171, 52 až 83 a 127 až 148.

Lymfotoxin je definován jako specifický lidský nádorový nekrotický faktor nebo jeho přírodní zvířecí analoga [D. Pennica a spol.: Nature 312, (20 až 27) (prosinec 1984), 724 až 729 a B. Aggarwal a spol.: J. Biol. Chem. 260(4), 2345 až 2354 (1985).].

25 Pojem strukturně podobný se vztahuje na dominantní vlastnosti aminokyselinových postranních řetězců, jako jsou například vlastnosti báze, neutrální nebo kyselé, hydrofilní nebo hydrofobní anebo přítomnost či nepřítomnost sterické zábrany. Substituce jedné aminokyseliny za jinou, strukturně podobnou aminokyselinu, je odborníkům známa jako konzervativní substituce.

30 Významným faktorem, zajišťujícím identitu polypeptidu jako lymfotoxinu, je možnost antiséra, které je schopno v podstatě zneutralizovat cytolytickou účinnost v podstatě homogenního, lymfoblastoidního (nebo přírodního) lymfotoxinu a také v podstatě zneutralizovat cytolytickou účinnost příslušného polypeptidu. Je však třeba si uvědomit, že imunologická identita
35 a cytotoxická identita nejsou nutně koextenzivní. Neutralizující protilátka lymfotoxinu na obrázku 2a nemusí vázat příslušný protein, protože neutralizující protilátka je směřována k místu na lymfotoxinu, které pouze sousedí s oblastí, jež je rozhodující pro lymfotoxinovou cytotoxickou účinnost, ale které se účastní procesu jako neutralizující protilátka sterickou zábranou aktivního místa lymfotoxinu. Příslušný protein, mutovaný v této neškodné oblasti, by
40 se nemusel dále vázat na neutralizující protilátku, byl by však lymfotoxinem v termínech podstatné homologie a biologické účinnosti.

45 Pro lymfotoxin, který byl získán kultivací lymfoblastoidních buněčných linií, byly stanoveny následující vlastnosti: molekulová hmotnost 20 000 nebo 25 000 podle stupně glykosylace a N-terminální heterogenity; glykosylace na Asn +62 (obrázek 2a); tendence k agregaci, zvláště k organizování multimerů; izoelektrický bod asi 5,8; labilita na pH (ztráta více než 50 procent cytolytické aktivity po 24-hodinovém skladování v pufru hydrogenuhličitanu amonného při koncentraci 10 µg/ml při pH hladinách méně než asi 5 nebo více než asi 10); podstatná ztráta účinnosti po inkubaci ve vodném roztoku po dobu pěti minut při 80 °C. Podle molekulové
50 hmotnosti byly identifikovány dva typy lymfoblastoidního lymfotoxinu. Typ lymfoblastoidního lymfotoxinu o molekulové hmotnosti 25 000 má na aminovém konci leucylovou skupinu. Polypeptidy, jejichž aminokyselinová sekvence má molekulovou hmotnost 25 000, se nazývají lymfotoxin s leucylovou skupinou na aminovém konci. Typ lymfoblastoidního lymfotoxinu

o molekulové hmotnosti 20 000 je charakteristický tím, že má na aminovém konci histidin. Odpovídající sekvence se pak nazývají lymfotoxin s histidylovou skupinou na aminovém konci. Je důležité, že tyto charakteristiky popisují nativní nebo divoký typ lidského lymfotoxinu, získaného z lymfoblastoidních buněčných kultur. Zatímco lymfotoxin zde definovaný zahrnuje
5 původní, glykosylovaný lymfotoxin, do rozsahu této definice mohou spadat i jiné podobné cytotoxické polypeptidy. Například glykosylace, obvykle spojená se zvířecím lymfotoxinem, může být modifikována při expresi v heterologní rekombinantní eukaryotické hostitelské buňce. Tím se získá modifikovaný lymfotoxin, jehož molekulová hmotnost nebo izoelektrický bod je mimo rozmezí, dané pro lidský lymfoblastoidní lymfotoxin. Lymfotoxin, který je úplně
10 neglykosylován, se vyrábí v rekombinantní bakteriální kultuře s molekulovou hmotností, izoelektrickým bodem a dalšími vlastnostmi, odpovídajícími modifikovanému. Post-translační procese pre-lymfotoxinu z prvních zvířecích typů v buněčné linii, která je odvozena od jiných zvířecích typů v buněčné linii, která je odvozena od jiných zvířecích druhů, může mít za výsledek jiné zbytky na aminovém konci, než je obvyklé u prvních zvířecích druhů. Podobně
15 i mutagenese, například, umožňuje měnit aminokyselinovou sekvenci a N-konec (N-terminus) lymfotoxinu, tím se modifikuje stabilita na pH, izoelektrický bod a podobné vlastnosti.

Prekládaná aminokyselinová sekvence lidského lymfotoxinu je popsána na obrázku 2a. Povážíme si, že tato sekvence zahrnuje presekvenci o 34 členech, o níž se předpokládá, že se
20 během procesu translatované transkripce v lidských buňkách odstraňuje (spolu se svými mutanty, "prelymfotoxin"), což vede k tomu, že se na aminovém konci tohoto typu objevuje leucylová skupina. Typ s histidylovou skupinou na aminovém konci je homologní s typem s leucylovou skupinou na aminovém konci až na to, že chybí prvních 23 aminokyselin z typu s leucylovou skupinou na aminovém konci. Všechny tři typy, tj. prelymfotoxin, lymfotoxin
25 s leucylovou skupinou na aminovém konci, rovněž tak jako methionylové, modifikované methionylové, mutantní a neglykosylované formy jsou zahrnuty v rozsahu pojmu lymfotoxin. Neglykosylované typy s leucylovou skupinou a s histidylovou skupinou na aminovém konci mají nižší molekulové hmotnosti než shora popsané homologní typy z lymfoblastoidních buněk.

Pre-lymfotoxin je typ lymfotoxinu, který je zahrnut v předcházející definici. Je charakterizován přítomností signálního (nebo leader) polypeptidu na aminovém konci molekuly. Nativní signální polypeptid lymfotoxinu se obvykle proteolyticky odštěpí z lymfotoxinu jako část sekrečního
30 procesu, v němž je protein vylučován z buňky. Signální peptid může být mikrobiální nebo savčí (včetně nativního, presekvence se 34 zbytky), s výhodou je však signální peptid homologní k hostitelské buňce. Některá spojení signál-lymfotoxin nejsou rozeznávána nebo "procesována" hostitelskou buňkou do lymfotoxinu bez met na N-konci. Taková spojení, obsahující mikrobiální signály, jsou užitečná, například jako lymfotoxinové imunogeny.
35

Poznamenejme, že výraz "schopný" nebo "způsobit" cytotoxické aktivity znamená, že
40 lymfotoxin obsahuje polypeptidy, které mohou být převedeny, například enzymatickou hydrolýzou, z neaktivního stavu analogického zymogenu na polypeptidový fragment, který vykazuje žádanou biologickou aktivitu. Pojem "schopný" in vitro nebo in vivo cytotoxické aktivity je míněn tak, že zahrnuje necytotoxické polypeptidy, které mohou být převedeny, například enzymatickou hydrolýzou, z neaktivního stavu analogického zymogenu na
45 polypeptidový fragment, který vykazuje definovanou biologickou aktivitu. Tak inaktivní prekurzory budou spojené proteiny, ve kterých je lymfotoxin vázán peptidovou vazbou na karboxylový konec jiného proteinu nebo polypeptidu. Sekvence na této peptidové vazbě nebo blízko ní je vybrána tak, aby byla citlivá na proteolytickou hydrolýzu, při níž se uvolní lymfotoxin, buď in vivo, nebo jako část výroby, in vitro. Typickými vazebnými sekvencemi jsou
50 lys-lys nebo arg-lys. Nelymfotoxinová složka, jako je například prolymfotoxin, je s výhodou homologní protein, takže minimalizuje imunogenicitu spojení. Homologní protein by měl být neškodný a neměl by se vázat na povrch buněk. Takto generovaný lymfotoxin pak bude vykazovat cytotoxickou účinnost, která je požadována definicí.

Zatímco lymfotoxin obvykle znamená lidský lymfotoxin, lymfotoxin z jiných zdrojů, například myši, vepřový, koňský nebo hovězí lymfotoxin také spadá pod definici lymfotoxinu, pokud jinak odpovídá standardům, které jsou shora popsány pro homologní oblasti a biologickou účinnost. Například bylo zjištěno, že hovězí a myši lymfotoxiny jsou značně (asi z osmdesáti procent) homologní s lidským lymfotoxinem. Lymfotoxin není specifický typ, například lidský lymfotoxin je účinný na nádory a neoplastické buněčné linie u myši. Může tedy být lidský lymfotoxin nebo lymfotoxin z jednoho druhu použit v terapii jiného druhu živočicha.

Lymfotoxin zahrnuje také multimerní formy. Lymfotoxin spontánně agreguje do multimerů, obvykle do dimerů nebo vyšších multimerů. Multimery jsou toxické, podle toho jsou vhodné pro použití v terapii in vivo. V rekombinantních hostitelích dochází k expresi lymfotoxinu ve formě monomeru. Po vzniku má však lymfotoxin tendenci spontánně vytvářet multimery. Terapeuticky užitečné jsou homogenní multimery nebo směs různých multimerů.

Variantní lymfotoxiny zahrnují předem stanovené nebo cílené, tj. místně specifické, mutace molekuly z obrázku 2a nebo jiných fragmentů. Variantní lymfotoxiny jsou definovány jako polypeptidy, jinak odpovídající definovaným vlastnostem lymfotoxinu s tím, že jsou charakterizovány aminokyselinovou sekvencí, která se od sekvence na obrázku 2a liší buď vynecháním (delecí), substitucí nebo inzercí zbytků. Nelidské lymfotoxiny zde popsané a alely lidského lymfotoxinu jsou považovány za variantní lymfotoxiny, jelikož to jsou místně řízené mutanty, které nemají žádný přírodní protějšek. Cílem mutagenese je konstrukce takové DNA, která kóduje lymfotoxin shora uvedený, ale vykazující vlastnosti, které modifikují biologickou účinnost přírodního lymfotoxinu nebo usnadňují výrobu lymfotoxinu. Například mutací lysin +89 kodonu dojde k expresi histidinové skupiny v místě lysinové skupiny. Histidin +89 se už trypsinem (který obvykle štěpí vazby arg-X nebo lys-X proteinů) nehydrolyzuje. Očekává se, že proteázová rezistence poskytne mutantu větší biologický poločas, než je tomu v případě lymfotoxinu, který má sekvenci na obrázku 2a (nebo její fragment). Na histidin mohou být mutovány i jiné lysinové a argininové skupiny lymfotoxinu, například lysin +28, lysin +19 nebo arginin +15.

Jak bylo shora diskutováno, jisté oblasti molekuly lymfotoxinu vykazují podstatnou homologii s podobně aktivním proteinem, označeným jako nádorový nekrotický faktor. Aminokyselinové skupiny a bezprostředně sousedící tyto v podstatě homologní oblasti jsou výhodné pro mutagenese, směrovanou k identifikaci lymfotoxinových mutantů, které vykazují variantní biologickou nebo cytotoxickou účinnost. Takové mutanty se připravují způsoby známými samy o sobě a pak se testují na žádanou biologickou účinnost, například zvýšenou cytotoxicitu na novotvar nebo - v případě lymfotoxinových typů - jsou zamýšleny pro imunizaci zvířat, možnost získat mocnější imunní odpověď. Následují příklady takových variantních lymfotoxinů: ala +168 je mutován na aminokyselinu s větveným řetězcem (val, ile nebo leu), mezi thr +163 a val +164 je vložena hydrofobní aminokyselina (např. Val, ile nebo leu), thr +163 je substituován tyrosinem, ser +82 je substituován lysinem, ser +42 je substituován izoleucinem, leucinem, fenylalaninem, valinem nebo histidinem, lys +84 je substituován glutaminem, tryptofanem, serinem nebo histidinem, ser +82 je vynechán, na leu +171 je napojen hydrofobní di- nebo tripeptid, thr +163 je substituován asparagovou kyselinou nebo lysinem, mezi glu +127 a pro +128 je vložen ala-lys, ser +70 je substituován lysinem nebo glycinem, thr +69 je substituován tyrosinem, lys +28 je substituován argininem nebo histidinem, his +32 je substituován argininem nebo lysinem, asp +36 je substituován prolinem, serinem threoninem, tyrosinem nebo glutamovou kyselinou, ser +38 je substituován tyrosinem, methioninem nebo glutamovou kyselinou, ser +61 je substituován threoninem, tyrosinem, histidinem nebo lysinem, gly +124 je substituován asparagovou kyselinou, serinem nebo tyrosinem, his +135 je substituován argininem, lysinem, tyrosinem, tryptofanem nebo prolinem thr +142 je substituován asparagovou kyselinou a gln +146 je substituován lysinem nebo threoninem.

Zvláště žádoucí skupinou mutantů jsou ty mutanty, v nichž jsou vynechány methioninové skupiny +20, +120 a +133 v lidském lymfotoxinu nebo s výhodou jsou substituovány odpovídajícími skupinami, které se nacházejí v lymfotoxinech jiných typů, jako jsou například ty, které jsou popsány jinde v této přihlášce. Například met +20, +120 a +133 jsou substituovány threoninem, serinem a valinem. Tyto aminokyseliny odpovídají skupinám v hovězím lymfotoxinu. Substituce se provádí způsobem, který je popsán v příkladu 9, až na to, že met +133 je mutován na val v dalším stupni mutagenese použitím fagu M13 Mp8 způsobem známým per se. Tato mutantní zvířecí hybridová lymfotoxinová DNA se používá místo DNA s leucylovou skupinou na aminovém konci (z příkladu 7) a exprese se jako napojená. Známým postupem se bromkyanem štěpí signál STII z hybridního lymfotoxinu. Izoluje se maturovaný variantní lymfotoxin s leucylovou skupinou na aminovém konci.

Jinými užitečnými variantními lymfotoxiny jsou takové lymfotoxiny, v nichž odpovídající skupiny lymfotoxinu jsou substituovány skupinami z nádorového nekrózového faktoru. Získají se tak hybridní varianty nádorového nekrózového faktoru s lymfotoxinem. Reprezentativním příkladem je substituce prvních 8, 9 nebo 10 skupin maturovaného nádorového nekrózového faktoru (např. val-arg-ser-ser-ser-arg-thr-pro-ser-asp) za prvních 27 skupin lymfotoxinu s leucylovou skupinou na aminovém konci. Tento variant je při přímé expresi v *E.coli* pravděpodobněji demethionylován na N-konci.

Zatímco místo mutace je předem stanoveno, není nutné, aby mutace sama byla předem determinována. Například při optimalizaci přípravy mutantního lymfotoxinu s histidinem +89 se provádí náhodná mutagenese na kodonu pro lysin +89. Expresí se získají lymfotoxinové mutanty, které se testují na optimální kombinaci cytotoxické účinnosti a proteázové rezistence.

Lymfotoxin může obsahovat také inserce, obvykle řádu asi od 1 do 10 aminokyselinových skupin, nebo delece asi 1 až 30 skupin. Pro konstrukci konečného plazmidu lze kombinovat substituce, delece, inserce nebo jakékoliv jejich kombinace. Inserce zahrnují také napojení na aminovém konci nebo na karboxylovém konci, např. hydrofobní rozšíření na karboxylovém konci. S výhodou se však provádí jenom substituční mutagenese. Mutace v kódující DNA však zřejmě nesmí být umístěna v sekvenci čtecí oblasti a s výhodou nevytváří ani komplementární oblasti, které by mohly produkovat sekundární mRNA strukturu. Extrakty vektorů transformované *E.coli*, které obsahují DNA kódující lymfotoxinové mutanty, které mají deleci posledních 16 aminokyselin na karboxylovém konci nebo prvních asi 33 skupin na aminovém konci lymfotoxinu s leucylovou skupinou na aminovém konci, nevykazují žádnou cytotoxickou účinnost. Důvody pro chybějící účinnost však nejsou známy; mohou to být kterékoliv z těchto důvodů, které jsou uvedeny v příkladu 1 níže.

Ne všechny mutace v DNA, která kóduje lymfotoxin, budou expresovány v konečném produktu rekombinace buněčnou kulturou. Například hlavní skupinou DNA se substitučními mutacemi jsou takové DNA, v nichž sekreční leader (signál) na obrázku 2a byl substituován jiným sekrečním signálem, buď delecí signálu o 34 skupinách nebo substitucí, která vymění většinu nebo celý původní signál, který má větší pravděpodobnost, že bude rozeznáván zamýšleným hostitelem. Například při konstrukci prokaryotického expresního vektoru je sekreční signál z obrázku 2a vynechán ve prospěch signálu bakteriální alkalické fosfatázy nebo tepelně stabilního enterotoxinu II, u kvasinek signál z obr. 2a je substituován signálem kvasinkové invertázy, alfa faktoru nebo kyselinové fosfatázy. To však neznamená, že by lidský sekreční signál nebyl rozeznáván jinými hostiteli, než jsou lidské buněčné linie. Jestliže je sekreční signál "rozeznáván" hostitelem, pak napojený protein, sestávající z lymfotoxinu a signálu, je obvykle štěpen na peptidové vazbě mezi signálem a lymfotoxinem při tom kroku, který vede k sekreci lymfotoxinu. I když je tedy mutantní DNA použita pro transformaci hostitele, výsledný lymfotoxin může být buď napojený nebo nativní lymfotoxin, což závisí na účinnosti hostitelské buňky v procesu napojení.

Jinou větší skupinou DNA mutantů, která není expresována jako lymfotoxinové varianty, jsou nukleotidové substituce, které zvyšují expresi, primárně vynecháním spárovaných a nespárovaných (smyčkových) [stem and loop] úseků v transkribované mRNA) viz doprovázející USA patentová přihláška 303 687, zahrnutá zde jako odkaz), nebo poskytují kodóny, které jsou snadněji transkribovány vybraným hostitelem, např. dobře známé preferenční kodóny E.coli pro E.coli expresi.

Mutantní nukleová kyselina se připravuje způsoby, známými per se [A. Hui a spol.: The EMBO Journal 3(3), 623 až 629 (1984), J. Adelman a spol.: DNA 2(3), 183 až 193 (1983), anglická patentová přihláška 2 130 219A, G. Winter a spol.: Nature 299, 756 až 758 (1982) a R. Wallace a spol.: Nucleic Acids Research 9(15), 3647 až 3656 (1981).]. Tyto způsoby zahrnují mutagenезi fágu M13, syntézu mutantního lymfotoxinového genu, jak je popsána v příkladu 1 a v dalších příkladech, nebo jiné způsoby, které jsou nebo budou známy odborníkům.

Nukleovou kyselinou, která kóduje lymfotoxin, je jakákoliv DNA nebo RNA sekvence, která kóduje polypeptid, který je v rámci zde uvedené definice lymfotoxinu, ať už její nukleotidové sekvence odpovídají nebo neodpovídají sekvencím, nalezeným v přírodě. Navíc, nukleová kyselina spadá do rozsahu zde uvedeného, to jest schopnosti hybridizace za alespoň nízkoselektivních podmínek na nukleovou kyselinu, kódující lymfotoxin, i když hybridizující nukleová kyselina nekóduje protein, který jinak vyhovuje požadavkům na lymfotoxin. Příkladem posledního by mohla být zkouška, že (díky krátké délce polypeptidu, který kóduje) není schopná exprese biologicky aktivního lymfotoxinu. Nukleová kyselina, kódující lymfotoxin, nebo hybridizovatelná, se vyrábí organickou syntézou způsobem, který je v podstatě uveden v příkladu 1, nebo se získává z přírodních zdrojů vyzkoušením genomových nebo cDNA knihoven, jak je uvedeno v příkladech.

Lymfotoxin podle tohoto vynálezu se připravuje obvykle postupem, při němž se hostitel transformuje vektorem, který nese nukleovou kyselinu, kódující žádaný lymfotoxin. Vektorem je konstrukce replikabilní DNA. Vektory jsou používány pro amplifikaci DNA nebo pro expresi DNA, která kóduje lymfotoxin. Expresním vektorem je konstrukce DNA, v níž sekvence DNA, kódující lymfotoxin, je odštěpitelně spojena s vhodnou regulační sekvencí, schopnou uskutečnit expresi lymfotoxinu ve vhodném hostiteli. Mezi takové regulační sekvence patří transkripční promotor, případná operátorová sekvence pro regulaci transkripce, sekvence, kódující vhodná ribosomální vazebná místa mRNA, a sekvence, které regulují terminaci transkripce a translace.

Vektorem může být plazmid, virus (včetně fága) nebo integrovatelný fragment DNA, tj. fragment, který je integrovatelný do hostitelova genomu rekombinací. Jakmile se jednou transformuje do hostitele, vektor se replikuje a funguje nezávisle na hostitelském genomu, nebo se v některých případech může do jeho genomu integrovat. V této přihlášce jsou někdy pojmy "plazmid" a "vektor" používány vzájemně zaměnitelně, jelikož plazmid je v současné době nejobvykleji používanou formou vektoru. Avšak všechny další formy vektorů, které mají stejnou funkci a které jsou nebo budou známy odborníkům z odborné literatury, jsou vhodné i pro použití zde.

Vhodné vektory obsahují replikon a kontrolní sekvence, které jsou odvozeny od typů, slučitelných s hostitelem zamýšlené exprese. Transformované hostitelské buňky jsou takové buňky, které byly transformovány nebo transfektovány lymfotoxinovými vektory, konstruovanými pomocí techniky rekombinantní DNA. Transformované hostitelské buňky pravidelně expresují lymfotoxin. Expresovaný lymfotoxin se buď ukládá intracelulárně, nebo se sekretuje do periplazmového prostoru nebo kultivačního supernatantu, což závisí na vybrané hostitelské buňce.

Oblasti DNA jsou odštěpitelně napojeny (jestliže mezi nimi existuje funkční vztah) mezi sebou. Například DNA presekvence nebo sekvenčního signálu jsou odštěpitelně napojeny na DNA

u polypeptidu, jestliže je expresována jako preprotein, který participuje při sekreci polypeptidu; promotor je odštěpitelně napojen na kódující sekvenci, jestliže kontroluje transkripci sekvence; nebo vazebné místo ribosomu je odštěpitelně napojeno na kódující sekvenci, jestliže je umístěno tak, že dovoluje translaci. Odštěpitelně navázán obvykle znamená styčný a v případě sekrečních signálů styčný a ve čtecí formě.

Vhodnými hostitelskými buňkami jsou prokaryoty, kvasinky nebo vyšší eukaryotické buňky. Mezi prokaryoty patří gramnegativní nebo grampozitivní organismy, například *E.coli* nebo *Bacilli*. Mezi vyšší eukaryotické buňky patří buněčné linie savců připravené tak, jak bude dále popsáno. Výhodnou hostitelskou buňkou je kmen *E.coli* W3110 (ATCC 27 325), rezistentní na fágy, který je popsán v příkladech, i když vhodné jsou i jiné prokaryoty, jako je například *E.coli* B, *E.coli* X1776 (ATCC 31 537), *E.coli* 294 (ATCC 31 446), typy *Pseudomonas* nebo *Serratia Marcesens*.

Výhodný pro expresi lymfotoxinu je systém prokaryotický hostitel - vektor. Mnoho vhodných mikrobiálních vektorů je dostupných. Mikrobiální vektor obvykle obsahuje počátek replikace, rozeznávaný zamýšleným hostitelem, promotor, který bude fungovat v hostiteli, a fenotypický selekční gen, například gen, kódující proteiny, propůjčující antibiotickou rezistenci nebo dodávající auxotrofní požadavek. Pro jiné hostitele se sestavují podobné konstrukce. *E.coli* se typicky transformuje plazmidem pBR322, plazmidem odvozeným od typu *E.coli* [E. Bolívar a spol.: *Gene* 2, 95 (1977).]. Plazmid pBR322 obsahuje geny ampicilinové a tetracyklinové rezistence, čímž je dostupný snadný prostředek pro identifikaci transformovaných buněk.

Expresní vektory musí obsahovat promotor, který je rozpoznáván hostitelským organismem, ale nikoliv klonujícími vektory. Promotor je obvykle homologní k zamýšlenému hostiteli. Mezi promotory, které se nejobecněji používají při konstrukci rekombinantní DNA, patří β -laktamázový (penicilinázový) a laktózoový promotorový systém [Chang a spol.: *Nature* 275, 615 (1978) a Goeddel a spol.: *Nature* 281, 544 (1979).] a tryptofanový promotorový systém (*trp*) [Goeddel a spol.: *Nucleic Acids Res.* 8, 4057 (1980) a přihláškova publikace evropského patentového úřadu 36 776.] a *tac*-promotor [H. De Boer a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 21 až 25 (1983).]. I když tyto promotory jsou nejčastěji používány, vhodné jsou i jiné známé mikrobiální promotory. Podrobnosti, týkající se jejich nukleotidových sekvencí, které byly publikovány, umožňují zručnému pracovníkovi odštěpitelně je ligovat na DNA kódující lymfotoxin v plazmidových vektorech [Siebenlist a spol.: *Cell* 20, 269 (1980).] a DNA kódující lymfotoxin. V dnešní době je výhodným vektorem derivát pBR322, obsahující promotor *E.coli* alkalické fosfatázy s *trp* Shine-Dalgarno sekvencí. Promotor a Shine-Dalgarno sekvence jsou odštěpitelně napojeny na DNA, kódující lymfotoxin, tj. jsou situovány tak, aby podporovaly transkripci lymfotoxinové mRNA z DNA.

Vedle prokaryotů se vektory, kódujícími lymfotoxin, transformují také eukaryotické mikroby, jako jsou například kvasinkové kultury. *Saccharomyces cerevisiae*, neboli obyčejné pekařské kvasnice, jsou nejobecněji používané nižší eukaryotické hostitelské mikroorganismy, i když je běžně dostupno mnoho jiných kmenů. Kvasinkové vektory obvykle obsahují počátek replikace z dvoumikronového kvasinkového plazmidu nebo samostatně se replikující sekvenci (ARS), promotor, DNA kódující lymfotoxin (včetně lidského pre-lymfotoxinu), sekvence pro polyadenylaci a terminaci transkripce a selekční gen. Vhodným plazmidem pro expresi lymfotoxinu v kvasinkách je plazmid YRp7 [Stinchcomb a spol.: *Nature* 282, 39 (1979), Kingsman a spol.: *Gene* 7, 141 (1979) a Tschemper a spol.: *Gene* 10, 157 (1980).]. Tento plazmid již obsahuje *trp1* gen, který poskytuje selekční znak (marker) mutantnímu kmeni kvasinek, který nemá schopnost růst v tryptofanu, například ATCC č. 44 076 nebo PEP4-1 [Jones: *Genetics* 85, 12 (1977).]. Přítomnost oblasti *trp1* v genomu kvasnicové hostitelské buňky tak poskytuje účinné okolí pro detekci transformace růstem za nepřítomnosti tryptofanu.

Mezi vhodné promotorové sekvence v kvasinkových vektorech patří promotory pro metalothionein, 3-fosfoglycerátkinázu [Hitzeman a spol.: J. Biol. Chem. 255, 2073 (1980).] a jiné glykolytické enzymy [Hess a spol.: J. Adv. Enzyme Reg. 7, 149 (1968) a Holland a spol. "Biochemistry 17, 4900 (1978).], jako jsou například enoláza, glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza, hexokináza, pyruvát-dekarboxyláza, fosfofruktokináza, glukózo-6-fosfát-isomeráza, 3-fosfoglycerát-mutáza, pyruvátkináza, triosofosfát-izomeráza, fosfoglukózo-izomeráza a glukokináza. Vhodné vektory a vhodné promotory pro použití při expresi kvasinkami jsou dále popsány R. Hitzemanem a spol.: Publikace evropského patentového úřadu č. 73 657. Jinými promotory, které mají další výhodu transkripce regulované podmínkami růstu, jsou promotor oblastí alkohol-dehydrogenázy 2, izocotychrom C, kyselinová fosfatáza, degradativní enzymy, spojené s metabolismem dusíku, shora uvedený metalothionein a glyceraldehyd-3-fosfát-dehydrogenáza a také enzymy, které jsou zodpovědné za využití maltózy a galaktózy. Při konstrukci vhodných expresních plazmidů se terminační sekvence, spojené s těmito geny, také ligují do expresního vektoru 3' sekvence kódujících lymfotoxin. Tím se zajistí polyadenylace mRNA a terminace.

Vedle mikroorganismů mohou být jako hostitelé také použity kultury buněk, které jsou odvozeny od mnohobuněčných organismů. Ty však nejsou výhodné, neboť až dosud byly s mikroby, které expresi poskytují lymfotoxin, získány vynikající výsledky. V principu lze pracovat s jakoukoliv kulturou vyšších eukaryotických buněk, ať už jde o kulturu obratlovců nebo nikoliv. Největší zájem se soustřeďuje na buňky obratlovců. V posledních letech se množení buněk obratlovců v kultuře (tkáňová kultura) stalo rutinní záležitostí ["Tissue Culture", Academic Press, ed. Kruse a Patterson, 1973]. Příklady užitečných hostitelských buněčných linií jsou buňky VERO a HeLa buňky, buněčné linie vaječníků čínské křečka a buněčné linie WI38, BHK, COS-7 a MDCK. Expresní vektory pro tyto buňky obsahují obvykle (jestliže je to nutné) počátek replikace, promotor, který je umístěn proti směru genu, který má být získán expresí, spolu s ribosomovým vazebným místem, místo stříhu RNA (jestliže se používá intron obsahující genomová DNA), polyadenylační místo a transkripční sekvence terminace.

Transkripční a translační regulační sekvence v expresních vektorech, které jsou určeny pro použití u transformovaných buněk obratlovců, se často získávají z virových zdrojů. Tak například používané promotory jsou obvykle odvozeny od Polyoma, Adenovirus 2 a nejvýhodněji od typu Simian Virus 40 (SV40). Tyto promotory jsou zvláště užitečné, protože se snadno získávají z viru jako fragment, který obsahuje také SV40 virový počátek replikace [Fiers a spol.: Nature 273, 113 (1978).]. Lze použít také menší nebo větší SV40 fragmenty za předpokladu, že obsahují sekvenci o přibližně 250 párech nukleotidů (párech bází) od místa Hind III k místu Bgl I, umístěnou ve virovém počátku replikace. Dále je také možné a často žádoucí využít lidský genomový promotor, řídicí a/nebo signální sekvence, obvykle spojené s lymfotoxinem, za předpokladu, že takové řídicí sekvence jsou slučitelné se systémy hostitelských buněk.

Počátek replikace se může získat buď konstrukcí vektoru, který by zahrnul exogenní počátek, jako například takový, který lze odvodit od SV40 nebo od jiného virového zdroje (např. Polyoma, Adenovirus, VSV nebo BPV), nebo se může získat replikačním chromozomálním mechanismem hostitelské buňky. Jestliže je vektor integrován v chromozomu hostitelské buňky, pak je často druhá možnost postačující. Transformací vyšších eukaryotických buněk lidskou prelymfotoxinovou DNA se připraví lymfotoxin s methionylovou skupinou na aminovém konci.

Při výběru výhodné hostitelské savčí buňky pro transfekci vektorů, které obsahují DNA sekvence, kódující jak lymfotoxin, tak dihydrofolát-reduktázu (DHFR), je vhodné vybrat hostitele podle toho, jaký typ DHFR proteinu se použije. Jestliže se používá DHFR protein divokého typu pak je výhodné vybrat takovou hostitelskou buňku, která je deficitní na DHFR; to umožní použít DHFR kódující sekvence jako markeru pro úspěšnou transfekci do selektivního média s nedostatkem hypoxanthinu, glycinu a thymidinu. V tomto případě je patřičnou

hostitelskou buňkou buněčná linie vaječníků čínského křečka, deficitní na DHFR aktivitu, která se připraví a namnoží způsobem, popsaným Urlaubem a Clasinem: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 77, 4216 (1980). Naopak, jestliže se jako řídicí sekvence použije DNA kódující DHFR protein s nízkou vazebnou afinitou k methotrexátu (MTX), pak není nutné používat buňky, rezistentní na DHFR. Jelikož mutantní DHFR je rezistentní na MTX, lze použít médium, obsahující MTX jako prostředek selekce za předpokladu, že hostitelské buňky samy jsou na MTX citlivé. Většina eukaryotických buněk, které jsou schopny absorbovat MTX, jsou citlivé na methotrexát. Jednou z takových užitečných buněčných linií je linie CHO, CHO-K1 (ATCC č. CCL 61).

Transformované hostitelské buňky jsou takové buňky, které byly transformovány nebo transfektovány lymfotoxinovými vektory, zkonstruovanými technikami rekombinantní DNA. Transformované hostitelské buňky obvykle expresují lymfotoxin. Expresovaný lymfotoxin se obvykle ukládá intracelulárně.

Lymfotoxin z rekombinantní kultury nesekretujících buněk se izoluje lyzí buněk a odstraněním částecovitěho materiálu odstředěním nebo podobným způsobem. Buňky, které vylučují lymfotoxin, se od kultivačního supernatantu oddělí odstředováním. Kontaminovaný roztok s lymfotoxinem se pak vyčistí způsoby shora popsanými, nebo imunoafinitně podle toho, jak je to popsáno níže v příkladu 4. Lymfotoxin se vyčistí do stupně, který je vhodný pro farmakologické použití. Vyčištěný lymfotoxin se umístí do konvenčních dávkových forem, např. fiol nebo injekcí. Používá se směs variantních lymfotoxinů, např. směs cytotoxických mutantních lymfotoxinů. Lymfotoxin se pro dlouhodobé skladování lyofilizuje. Může se také skladovat ve vodných roztocích se stabilizátory a excipienty, například v izotonických solných roztocích. Pacientům se lymfotoxin podává způsobem, který popsal B. Aggarwal a spol.: Evropská patentová přihláška 100 641.

Lymfotoxinové prostředky se podávají živočichům, kteří mají nádory. Způsob podávání je shodný se známými způsoby podávání, např. intravenózně, intraperitoneálně, podkožně, intramuskulárně, vnitřní infuzí nebo injekcí sterilních roztoků lymfotoxinu, a nebo lze použít i níže popsaného systému s pomalým uvolňováním lymfotoxinu. Lymfotoxin se podává do místa poškození, tj. přímo injekcí do pevných nádorů. V případě rozsetých nádorů, jako je například leukémie, je výhodné podávat lymfotoxin intravenózně nebo do lymfatického systému. Nádory orgánů v břišní dutině, jako je například rakovina vaječníku, se s výhodou léčí intraperitoneálně infuzí použitím prostředků pro peritoneální dialýzu a tomu odpovídajících roztoků. Obvykle se však lymfotoxin podává kontinuálně infuzí, i když je přijatelné i podávání bolus injekcí. Je žádoucí, aby byl lymfotoxin podáván ve formě implantovatelných prostředků, které jej pomalu uvolňují. Příklady vhodných systémů pro proteiny, které mají molekulovou hmotnost, odpovídající dimerům nebo trimerům lymfotoxinu, jsou kopolymery L-glutamové kyseliny a gama ethyl-L-glutamátu [V. Sidman a spol.: Biopolymers 22(1), 547 až 556 (1983).], poly-(2-hydroxyethyl-methakrylát) [R. Langer a spol.: J. Biomed. Mater. Res. 15, 167 až 277 (1981) a nebo v ethylen-vinylacetátu [R. Langer a spol.: Chem. Tech. 12, 98 až 105 (1982).] tamtéž.]. Prostředky, obsahující lymfotoxin, se implantují do míst, z nichž byly nádory chirurgicky odstraněny. Lymfotoxin se také používá v polopropustných mikrotobolkách nebo liposomech pro injekční podání do nádoru. Tento způsob podávání je zvláště užitečný u chirurgicky neodstranitelných nádorů, např. u mozkových nádorů.

Množství lymfotoxinu, které se při podávání používá, závisí například na způsobu podávání, na typu nádoru a na stavu pacienta. Bude nutné, aby terapeuti stanovili dávku a modifikovali způsob podávání tak, jak je žádoucí pro získání optimální cytotoxické účinnosti na cílový nádor; to lze stanovit například biopsií nádoru nebo diagnostickými testy na údajné rakovinné znaky, jako je například karcinoembryonní antigen, z pohledu jakékoliv rekombinantní toxicity ve zvýšené dávce. Dávkování rekombinantního lymfotoxinu u myši v dávkách od 50 do 200 $\mu\text{g/kg}$ tělesné

hmotnosti/den při intravenózním podávání je obvykle v podstatě netoxické a účinné in vivo. Režim dávkování se bude zřejmě u různých zvířat lišit.

Podle této přihlášky byl objeven způsob získávání protilátky, neutralizující lymfotoxin. Neutralizující protilátka je definována jako protilátka, která je schopna imunologicky vázat lymfotoxin (takový lymfotoxin, který je definován ve smyslu této přihlášky) takovým způsobem, že v podstatě sníží jeho účinnost v testech cytostatické nebo cytolytické účinnosti lymfotoxinu, jako je například dále popsáný test myšiho L929. Skutečnost, že protilátka je schopna zneutralizovat účinnost lymfotoxinu však neznamená, že se protilátka musí vázat přímo na aktivní lymfotoxin nebo na receptorové vazebné místo. Protilátka může ještě v podstatě neutralizovat účinnost lymfotoxinu i tehdy, jestliže se stericky naváže na oblast, která sousedí s kritickým místem, tj. sousedí se miní ve smyslu konformačního sousedství a nikoliv nutně z hlediska sousedství v aminokyselinové sekvenci.

Při pokusech přípravy neutralizující protilátky (monoklonální) proti lymfotoxinu se ukázalo, že je obtížné imunizovat myši tak, aby se ve zvířatech vytvářela nebo aby se zvýšila hladina protilátky, neutralizující lymfotoxin. Ani imunizace lymfoblastoidním lymfotoxinem ani lymfotoxinem zkříženě svázaným s glutaraldehydem nevedla k vytvoření jakéhokoliv detekovatelného množství neutralizující protilátky v séru imunizovaných myší, i když se nezvýšilo množství ne-neutralizující anti-lymfotoxinové protilátky, detekovatelné enzymovým imunotestem. Avšak imunizace s adsorpčním komplexem: lymfotoxin - oxid hlinitý ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) vedle ke zvýšení neutralizující protilátky, i když před imunizací tímto komplexem získání jakékoliv aktivity u zvířat bylo neúspěšné. Příprava oxidu hlinitého a jeho použití při výrobě antiséra je popsána v "Methods in Immunology and Immunochemistry I", strana 197 až 229, ed. C. Williams a spol. (1967).

Buňky ze sleziny ze zvířat, produkujících neutralizující protilátky, byly spojeny s buňkami myšiho myelomu. V průměru muselo být testováno 50 až 100 klonů, aby se získal jeden klon, který syntetizuje neutralizující protilátku. Způsob testování klonů na žádanou účinnost je rutinní záležitost, dobře známá zručným odborníkům, která je dobře reprodukovatelná s minimálním experimentálním úsilím.

Lze zde použít sérum, plazmu nebo IgG frakce z imunizovaných zvířat, stejně jako imunoglobuliny, sekretované hybridomy, generovanými ze slezinových nebo lymfatických buněk imunizovaných zvířat. Ve výhodném uspořádání se neutralizující protilátka získá v podstatě čistá bez dalších antilymfotoxinových protilátek z hybridomové kultury.

Neutralizující protilátka se imobilizuje adsorpcí na povrchu, např. termoplastů, jako je například polystyren, nebo se kovalentně naváže na matrice, jako je například Sepharosa, aktivovaná bromkyanem. Potom se použije pro imunotesty nebo pro imunoafinitní čištění. Jelikož protilátka je neutralizující protilátkou, používá se pro adsorpci nebo detekci biologicky účinného lymfotoxinu nebo jeho fragmentů. Protilátka je zvláště užitečná v imunoradiometrických ("sandwich") imunotestech s ne-neutralizující antilymfotoxinovou monoklonální protilátkou nebo polyklonálním antisérem, které obsahuje ne-neutralizující protilymfotoxin. Imunotest se provádí tak, že se jako značená složka používá buď neutralizující nebo neneutralizující protilátka. Značení se provádí nějakou detekovatelnou sloučeninou, jako je například fluorescenční, chemiluminiscenční nebo radioizotopové označení způsoby, známými z odborné literatury. Pro lymfotoxinové imunotesty kompetitivního typu se lymfotoxin označí stejným způsobem. Pro přípravu jak lymfotoxinu, tak lymfotoxinové protilátky se značeným atomem, je vhodná radiojodace chloraminem T nebo způsob, který popisuje J. Klostergaard a spol.: Mol. Immun. 18, 455 (1980).

Pro zjednodušení příkladů bude nyní na některé často se vyskytující způsoby odkazováno krátkými vysvětleními.

Plazmidy jsou označovány malým p, za kterým následují velká písmena a/nebo číslice. Výchozí plazmidy, používané v tomto popisu, jsou komerčně dostupné, jsou veřejně dostupné bez jakýchkoliv restričních omezení, nebo je lze z takových dostupných plazmidů publikovanými způsoby zkonstruovat. Vedle toho jsou v odborné literatuře známé ekvivalentní plazmidy, jak je zřejmé normálnímu odborníkovi.

Pojem "štěpení" DNA se týká katalytického štěpení DNA enzymem, který působí na jistých místech v DNA. Takové enzymy se nazývají restriční enzymy. Místa, na která jsou tyto enzymy specifické, se nazývají restriční místa. Pojem "částečné štěpení" znamená neúplné rozštěpení restričním enzymem, tj. štěpení probíhá za takových podmínek, že některá místa (ne všechna) v DNA substrátu jsou štěpena danou restriční endonukleázou. Různé restriční enzymy, které se zde používají, jsou komerčně dostupné. Při jejich používání se postupovalo podle návodu dodavatelů enzymů, pokud jde o reakční podmínky, katalyzátory a další požadavky. Restriční enzymy jsou obvykle označeny zkratkami, které se skládají z velkého písmena, po němž následuje další písmeno (písmena) a potom obvykle číslo, reprezentující mikroorganismus, z něhož byl restriční enzym původně získán. Obvykle se pracuje s asi 1 mikrogramem plazmidu nebo fragmentu DNA a asi 1 jednotkou enzymu v asi 20 µl pufovaného roztoku. Množství příslušných pufrů a substrátů pro ten který restriční enzym jsou dána výrobcem. Obvykle se pracuje při inkubační době asi 1 hodinu při teplotě 37 °C, ale oboje se může měnit podle instrukcí dodavatelů. Po inkubaci se protein odstraní extrakcí fenolem a chloroformem a štěpená nukleová kyselina se z vodné fáze izoluje vysrážením ethanolem. Po štěpení restričním enzymem následuje někdy hydrolyza terminálního 5' fosfátu bakteriální alkalickou fosfatázou, aby se zabránilo tomu, aby se restričně rozštěpené konce fragmentu DNA "zcirkularizovaly", nebo aby vytvořily uzavřenou smyčku, což by pak překáželo inzerci jiného fragmentu DNA do restričního místa. Pokud není jinak uvedeno, nenásleduje po štěpení plazmidů defosforylace na 5' konci. Pro defosforylaci se používají konvenční postupy a činidla [T. Maniatis a spol.: Molecular Cloning, str. 133 až 134 (1982).].

Pojem "izolace" daného fragmentu DNA z restričního štěpení znamená, že se rozštěpená část oddělí elektroforézou na polyakrylamidovém gelu, fragment, o který se zajímáme, se identifikuje srovnáním jeho pohyblivosti s fragmenty označené DNA o známé molekulové hmotnosti, odstraní se sekce gelu, která obsahuje žádaný fragment a gel sám se oddělí od DNA. Tento postup je všeobecně známý. Viz například R. Lawn a spol.: Nucleic Acids Res. 9, 6103 až 6114 (1981) a D. Goeddel a spol.: Nucleic Acids Res. 8, 4057 (1980).

"Southernova" analýza je způsob, kterým je přítomnost sekvencí DNA v rozštěpené části nebo v prostředku, obsahujícím DNA, potvrzena hybridizací na známý fragment značeného oligonukleotidu nebo DNA. Southernova analýza bude znamenat rozdělení rozštěpených fragmentů na 1% agaróze, denaturaci a přenesení na nitrocelulózu způsobem podle E. Southerna: J. Mol. Biol. 98, 503 až 517 (1975) a hybridizaci tak, jak ji popsal T. Maniatis a spol.: Cell 15, 687 až 701 (1978).

Pojem "transformace" znamená zavedení DNA do organismu tak, že DNA je schopna replikace, a to buď jako mimochromozomální prvek, nebo jako integrální část chromozomu. Pokud není jinak uvedeno, pak způsob, použitý v této přihlášce pro transformaci E.coli, je způsob s chloridem vápenatým podle Mandela a spol.: J. Mol. Biol. 53, 154 (1970).

Pojmem "ligace" se označuje tvoření fosfodiesterových vazeb mezi dvěma fragmenty dvouvláknové nukleové kyseliny (T. Maniatis a spol.: tamtéž str. 146.). Pokud není jinak uvedeno, provádí se ligace za použití známých pufrů a za známých podmínek s deseti jednotkami T4 DNA ligázy ("ligáza") a 0,5 µg přibližně ekvimolárních množství fragmentů DNA, které mají být ligovány.

Pod pojmem "příprava" DNA z transformantů se rozumí izolace plazmidové DNA z mikrobiální kultury. Pokud není jinak uvedeno, může se použít alkalický /SDS způsob podle Maniatis a spol.: tamtéž, str. 90.

5

Pojem "oligonukleotidy" znamená krátké jednovláknové nebo dvouvláknové polydeoxy-nukleotidy, které se chemicky syntetizují podle způsobu, uvedeného v citaci v příkladu 1, načež se vyčistí na polyakrylamidových gelech.

10

Všechny citace literatury jsou zde výslovně zahrnuty jako odkazy.

Příklady provedení vynálezu

15

Příklad 1

Čištění a sekvenování lymfotoxinu

20

Lidská lymfoblastoidní buněčná linie RPMI-1788 (ATCC č. CCL-156) se nechá růst v patnácti-litrové vibrující baňce do buněčné hustoty 4.10^5 buněk/ml za použití bezsérového kultivačního média (RPMI-1640). Lymfotoxin byl indukován 10 až 20-krát (na 500 až 1000 jednotek lymfotoxinu na mililitr; stanoveno níže popsaným způsobem) nad základní hladiny přidáním 20 ng/ml myristan-acetátu forbolu v bezsérovém médiu RPMI-1640. Po 65 hodinách kultivace se

25 buňky odfiltrují, lymfotoxinová účinnost ve filtrátu se absorbuje na koloně (5 cm x 20 cm) se skleněnými kuličkami o kontrolované velikosti pórů (Electronucleonics), ekvilibruje se 5 mM fosfátového pufru (pH 7,4) a eluuje se 50% ethylenglykolem v 5 mM fosfátového pufru (pH 7,4). Pro inhibici mikrobiálního růstu se do všech pufrů během čištění přidá roztok 0,1 mM fenylmethyl-sulfonyl-fluoridu (PMSF), inhibitoru proteázy a 1 mM azidu sodného. Eluát ze

30 skleněných kuliček obsahoval 84 000 jednotek lymfotoxinu na mg proteinu. Následovala chromatografie na DEAE celulóze, chromatografie na Sepharose lektinu z čočky a preparativní nativní PAGE, jak popisuje B. Aggarwal a spol.: J. Biol. Chem. 259(1), 689 až 691 (1984). Homogenita proteinu, odpovědného za cytotoxickou účinnost, byla stanovena SDS-PAGE, HPLC na koloně s Lichrosorbem RP-18 na obrácených fázích a aminoterminální sekvenací.

35

Tento lymfotoxinový přípravek obsahoval více než 95 hmotnostních procent lymfotoxinu s leucylovou skupinou na aminovém konci s molekulovou hmotností přibližně 25 000 na SDS-PAGE. Teoretická hmotnost (molekulová hmotnost) proteinové složky s leucylovou skupinou na N-konci je 18 664. Zbývajících přibližně 6500 se připisuje glykosylovanému postrannímu řetězci

40 na Asn +62 a snad i dalším cukerným zbytkům, navázaným přes atom kyslíku. Supernatant tkáňové kultury obsahoval údajné multimery tohoto typu (molekulová hmotnost 60 000 podle TSK-HPLC nebo 64 000 podle chromatografie na Sephadexu G-100).

45

Zbývajících 5 procent lymfotoxinové směsi byly typy s histidylovou skupinou na N-konci s molekulovou hmotností asi 20 000. Oba typy vykazovaly v podstatě tutéž cytolytickou aktivitu, alespoň v rámci omezení dále popsaného testu lyze vyšších fibroblastových buněk.

50

Trypsinové štěpení původních molekul lymfotoxinu poskytlo pouze několik fragmentů. Lymfotoxin s histidylovou skupinou na aminovém konci byl rozštěpen mezi aminokyselinami v poloze 89 a 90 na dva fragmenty. Totéž štěpení lymfotoxinu s leucylovou skupinou na aminovém konci poskytlo štěpením mezi polohami 15 a 16, 19 a 20 a 89 a 90 čtyři fragmenty.

Mikrosekvenací Edmanovou degrační technikou byly získány informace o sekvenci molekuly a také o produktech, získaných trypsinovým štěpením.

Další informace o sekvenci byly získány z fragmentů lymfotoxinu, připravených štěpením karboxypeptidázou P, chymotrypsinem, kyselinou octovou a bromkyanem. Tímto způsobem byla stanovena téměř úplná sekvence lidského lymfotoxinu. Bylo určeno 156 sousedících zbytků na aminovém konci. Z těchto sekvenčních informací vyplynulo, že rozdíl mezi těmito dvěma typy je v přítomnosti 23 zbytků na aminovém konci v typech s leucylovou skupinou na aminovém konci, přičemž tyto zbytky nebyly nalezeny v typech s histidylovou skupinou na aminovém konci. Prokázat přítomnost karboxylové terminální sekvence za prvními třemi zbytky je obtížné, protože v této oblasti jsou přítomny peptidové vazby a protože zbytky mají hydrofobní povahu.

Byl navržen syntetický gen, který by kódoval sekvenci proteinu v rozsahu daném mikro-sekvenováním. Navržený protein s výhodou obsahuje obvykle výhodné kodóny *E.coli*. To znamená, že vzácně používané kodóny *E.coli* nebyly v sekvenci použity. Pokud nebyla zřejmá výhodnost kodónu *E.coli*, pak byly použity lidské výhodné kodóny. Touto výhodností se dosáhlo exprese v *E.coli* a také toho, že syntetický gen by mohl být užitečný jako sonda k identifikaci přírodní DNA sekvence z knihoven lidských cDNA nebo z genomových knihoven. Pro konstrukci fragmentů a pro další manipulaci s genem byla navržena pro sekvenci restriční místa XbaI, BamHI, HindIII a BglII.

Padesát osm původních oligomerů, které byly navrženy pro syntetický lymfotoxinový gen, bylo syntetizováno fosforitanovou metodou v pevné fázi podle M. Matteucciho a spol.: J. Amer. Chem. Soc. 103, 3185 až 3190 (1981) a S. Beaucageho a spol.: Tetr. Letters 22, 1859 až 1862 (1981). Velikost těchto oligomerů se pohybovala mezi 16 a 20 bázemi (viz obrázek 1a). Oligomery se překrývaly v délce 6 bází. Celý sestavený gen je uveden na obrázku 1b. Gen byl zkonstruován ze tří oddělených částí. První část, segment A, měl délku 117 párů nukleotidů a představoval 5' kódující oblast aminového konce s leucylovou skupinou na aminovém konci. Segment B, který měl délku 145 párů nukleotidů, představuje DNA kódující střední část lymfotoxinové molekuly. O segmentu C o délce 217 párů nukleotidů se předpokládá, že kóduje až na 16 aminokyselinových zbytků celý karboxylový konec lymfotoxinu. Oligomery, které byly potřebné pro syntézu každého segmentu, byly vyčištěny elektroforézou a spojeny. Aby chyby při syntéze byly co nejmenší, byly vybrány oligomery o relativně malé velikosti (tj. 16 až 20 párů nukleotidů).

Každá skupina oligomerů byla fosforylována v reakci, která obsahovala 20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM chloridu hořečnatého, 20 mM dithiothreitolu, 0,5 mM ATP a 15 jednotek T4 polynukleotid.kinázy v objemu 50 μ l. Reakce obsahovala přibližně 50 pmol každého oligomeru. Po 30 minutách při teplotě 37 °C byla aktivita kinázy zničena zahřátím na 65 °C. Směs se nechala během jedné hodiny pomalu ochladit na 20 °C. Fosforylované oligomery byly ligovány přidáním 10 jednotek T4 DNA ligázy. Reakce se nechá probíhat dvě hodiny při 20 °C. DNA ligáza se zahřátím deaktivuje. Ligované oligomery se štěpily tři hodiny při 37 °C restričními endonukleázami, které rozeznávají navržená koncová místa [např. XbaI a BamHI u segmentu A]. Fragmenty každého segmentu se izolují elektroforézou na sedmiprocentním polyakrylamidovém gelu. Pro každý segment se identifikují vybarvením ethidium-bromidem fragmenty o přesné pohyblivosti a elektroeluují se z gelu. Plazmid pFIFtrp69 [D. Goeddel a spol.: Nature 287, 411 až 416 (1980) nebo Crea a spol.: evropská patentová přihláška 0 048 970.] se rozštěpí působením XbaI a BamHI. Elektroforézou na 6% polyakrylamidovém gelu se izoluje velký vektorový fragment. Do fragmentu pFIFtrp69 se liguje asi 50 ng segmentu A. Podobně se segment B liguje do plazmidu pBR322, rozštěpeného BamHI a HindIII, a segment C do plazmidu pLeIFA-125-1, rozštěpeného působením HindIII a BglII [D. Goeddel a spol.: Nucleic Acids Research 8, 4057 až 4073 (1980).]. Ligační reakční směsi se transformují do *E.coli* ATCC 31 446. Výsledné rekombinantní plazmidy se charakterizují analýzou restričními endonukleázami a sekvenováním DNA metodou chemické degradace podle Maxama a Gilberta. Pět ze šesti klonů segmentů A obsahovaly žádanou sekvenci. Byly izolovány čtyři

plazmidy ze segmentu B a čtyři plazmidy ze segmentu C a všechny tyto inzerty měly správné sekvence. Každý segment byl izolován rozštěpením restrikcí endonukleázami, které rozeznávaly koncová místa a potom byly ligovány do plazmidového vektoru pFIFtrp69, rozštěpeného působením XbaI a BglII. Výsledný rekombinantní plazmid pLTXBI byl
 5 charakterizován sekvenováním vloženého fragmentu XbaI-BglII, který obsahoval sekvenci, uvedenou na obrázku 1a.

Pro stanovení toho, zda syntetický gen bude skutečně produkovat biologický účinný lymfotoxin, se *E.coli* transformanty nechají růst v minimálním médiu za podmínek dereprese trp promotoru
 10 a exprese genu syntetického lymfotoxinu. Kultury se nechají růst do optické hustoty 1,0 při 550 nm a izolují se odstředěním. Buněčné pelety se suspendují v jedné desetině objemu, načež se lyzují sonikací.

Aktivita lymfotoxinu se stanoví modifikovaným testem buněčné lyze podle B. Spofforda: J. Immunol. 112, 2111 (1974). Ve stručnosti - myši fibroblastové buňky L-929 se nechají růst na mikrotitrovacích destičkách za přítomnosti aktinomycinu D. Po 12 až 18 hodinách se do každé
 15 jamky přidá 0,125 ml seriálově zředěvaného roztoku, který se testuje na lymfotoxin. Po 18 hodinách se destičky promyjí. Lyze buněk, indukovaná lymfotoxinem, se stanoví obarvením destiček 1% roztokem krystalové violeti ve směsi methanolu s vodou (v poměru 1 : 4, objemové díly). Intenzita zabarvení byla pozorována jak vizuálně, tak spektrometricky při 450 nm a 570 nm
 20 pomocí spektrofotometru Dynatech. U buněk, které byly do mikrotitrovací jamky vysety jenom společně s kultivačním médiem, došlo k 0% lyzi, zatímco u buněk, které byly vysety spolu s roztokem 3M hydrochloridu guanidinu, byla v konečném stadiu pozorována 100% lyze. Jedna jednotka lymfotoxinu je definována jako množství lymfotoxinu, kterého je potřeba k lyzi 50 %
 25 buněk z 12 000 buněk, vysetých do každé jamky. Poznamenejme, že lze použít také jiné testy cytotoxické účinnosti. Viz například: B. Aggarwal a spol. v "Thymic Hormones and Lymphokines", ed. A. Goldstein, Spring Symposium on Health Sciences, George Washington University Medical Center, 1983 (buněčná linie A549, která je v tomto materiálu citovaná, je dostupná z ATCC pod označením CCL185). Kultivační lyzáty nevykazovaly ve shora popsaném
 30 testu na myších buňkách žádnou cytotoxickou účinnost. Kontrolní lyzáty z kultur, které expresi poskytují gama interferon, neobsahují gama interferonovou aktivitu. Z tohoto výsledku lze usoudit, že syntetický gen nekóduje aktivní lymfotoxin. Pro to existuje několikero vysvětlení. Například: 1) *E.coli* degraduje lymfotoxin, 2) gen lymfotoxinu se netranskribuje v *E.coli*, 3) lymfotoxinová informace se nepřenáší do *E.coli*, 4) protein nemá patřičnou sekvenci díky
 35 chybě v sekvenci proteinu, nebo 5) sekvence 16 zbytků na karboxylovém konci nebo její část je skutečně nutnou podmínkou pro účinnost příslušné konfigurace molekuly lymfotoxinu.

Příklad 2

40

Postup získání cDNA, kódující lymfotoxin

RNA se izoluje z kultury neadherentní buněčné frakce lymfocytů lidské periferní krve po 48 hodinách od indukce myristát-acetátem forbolu (10 ng/ml), stafylokokovým enterotoxinem B
 45 (1 µg/ml) a thymosinem α-1 [S. Berger a spol.: Biochemistry 18, 5143 až 5149 (1979)]. Tato kultura produkuje aktivitu 400 jednotek lymfotoxinu na mililitr supernatantu. mRNA se zkoncentruje adsorpcí na imobilizovaný oligodT, eluuje se a cDNA se připraví reverzní transkripcí [P. Gray a spol.: Nature 295, 503 až 508 (1982)]. Pro přípravu cDNA kopie mRNA standardními způsoby se použije reverzní transkriptáza. Druhé vlákno se připraví (také
 50 standardními způsoby) Klenowovým zpracováním. cDNA se zpracuje s S-1 nukleázou, čímž se odstraní vlásenková smyčka. Po vložení této cDNA do vektoru se konce ligují k adaptéru nebo linkeru, takže se vytvoří 5' a 3' místa pro restrikcí enzymy nebo s výhodou kohezivní konce pro

místa předem stanovených restričních enzymů. Pro tento účel byl použit oligonukleotid
 5' HO-AATTCATGCGTTCTTACAG
 GTACGCAAGAATGTC-P 5'.

- 5 Oligonukleotid se liguje k cDNA. cDNA se reizoluje elektroforézou z polyakrylamidového gelu. Obecně dostupný fág λ gt10 (nebo jeho v podstatě ekvivalent, fág λ gt11, který je dostupný z ATCC) se rozštěpí působením EcoRI. Izoluje se lineární fragment [M. Wickens a spol.: J. Biol. Chem. 253, 2483 až 2495 (1978)]. Napojený reverzní transkript a štěp λ gt10 se ligují. Ligační směs se použije pro transfekci *E.coli* C-600 nebo jiného známého hostitele, podléhajícího infekci fágů λ . Na 15 cm desku se vyseje přibližně 10 000 rekombinantních fágů, které se testují nízkoselektivní hybridizační metodou přes jednotlivé plaky [T. Maniatis a spol.: Cell 15, 687 až 701 (1978) a P. Grey a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80, 5842 až 5846.] za použití 32 P-
10 značené sondy, připravené ze segmentu A na obrázku 1a způsobem podle J. Taylora a spol.: Biochem. Biophys. Acta 442, 324 až 330 (1976), v němž se používají DNA primery telecího
15 brzlíku (PL Biochemicals). Duplikátní nitrocelulózové filtry se hybridizují nízkoselektivní metodou sondou ($5 \cdot 10^7$ impulzů za minutu) ve 20% formamidu. Filtry se promyjí dvakrát 0,3M chloridem sodným, 0,03M citranem sodným a 0,1% roztokem dodecylsulfonátu sodného (SDS) při 37 °C.
- 20 Sondou byly hybridizovány dva fágy; fágy byly přečištěny přes jednotlivé plaky. Vyčištěné fágy se hybridizovaly jak sondou segmentu A, tak sondou, připravenou ze segmentu B. cDNA inzerty ze dvou hybridizovaných fágů, λ LT1 a λ LT2, byly subklonovány do M13mp8 a sekvenovány dideoxy-řetězovou terminační metodou [A. Smith: Methods in Enzymology 65, 560 až 580 (1980)]. Inzert ve λ LT2 obsahoval pouze asi 600 párů nukleotidů a neobsahoval celou
25 3' kódující oblast lymfotoxinu. Inzert v λ LT1 obsahoval úplnou kódující oblast lymfotoxinu s leucylovou skupinou na aminovém konci, spolu s 650 páry nukleotidů 3' netranslované oblasti (obsahující souhlasný polyadenylační signál) a kodóny pro 18 koncových aminokyselin na leucylovém konci. Jelikož to není kódující oblast celého lymfotoxinu, byla z cDNA inzertu LT1 připravena další sonda, značená 32 P, a použita k testování dalších 25 000 rekombinantních fágů
30 λ gt10 při vysoké selektivitě (viz T. Huynh a spol. v "Practical Approaches in Biochemistry", IRL Press, Oxford, 1984.). Bylo izolováno 12 dalších hybridizovaných fágů. Sekvence nejdelšího inzertu z λ LT11 je uvedena na obrázku 2a. Nejdelší otevřená čtecí oblast byla translatována, a to počínaje prvním pozorovaným ATG. Číslo nad řádkou označují polohu aminokyseliny, čísla pod řádkou označují polohu nukleotidu. Leucylový zbytek, který je označen "1", znamená první
35 zbytek, sekvenovaný z lymfotoxinu s leucylovou skupinou na aminovém konci (obr. 1a) a také první zbytek z aminového konce maturovaných typů lymfotoxinu. Prvních 34 zbytků reprezentuje signální sekvenci. Zbytky 156 až 171 nebylo možné určit sekvenací lymfotoxinu, byly však odvozeny od sekvence nukleotidů.

40

Příklad 3

Konstrukce expresního vektoru hybridního syntetického genu /přirodní cDNA pro lymfotoxin s leucylovou skupinou na aminovém konci/

45

- Tato konstrukce je uvedena na obrázku 2b. Plazmid pLTXB1 (obsahující neaktivní syntetický gen) se částečně rozštěpí působením EcoRI a PstI. Izoluje se fragment o 685 párech nukleotidů, který obsahuje DNA, kódující 125 zbytků na N-konci lymfotoxinu. Fragment byl dále částečně rozštěpen účinkem PstI, protože na zbytku 10 (obrázek 1a) existuje další PstI místo. Fragment se
50 301 párem nukleotidů, který obsahuje DNA, kódující 51 aminokyselinu lymfotoxinu na C-konci, byl izolován po rozštěpení subklonované cDNA z fágů λ LT1 působením EcoRI a PstI (tato místa jsou uvedena na obrázku 2a: polohy nukleotidů 554 a 855). Tyto fragmenty se izolují elektroforézou na 5% polyakrylamidu a elektroelucí. Tyto fragmenty byly ligovány do plazmidu

pBR322, který se rozštěpí působením EcoRI a defosforyluje bakteriální alkalickou fosfatázou. Tím se sníží množství vedlejších transformantů. Výsledný expresní plazmid byl charakterizován, pokud jde o příslušnou orientaci a sekvenci, štěpením restriční endonukleázou a sekvenováním DNA. Lymfotoxin s leucylovou skupinou na aminovém konci byl expresován transformací *E.coli* 31446 plazmidem pLTtrpl s kultivací transformantů v prostředí, které obsahovalo tetracyklin, po dobu 4 až 6 hodin při teplotě 37 °C do dosažení optické hustoty 1,0. Buněčné lyzáty obsahovaly cytotoxickou účinnost. Bylo zjištěno, že aminový konec s leucylovou skupinou expresovaných lymfotoxinů je substituován blokováním methionylovým zbytkem. Předpokládá se, že produktem této syntézy je spíše formyl-methionylový než methionylový typ.

Příklad 4

Imunoafinitní vyčištění lymfotoxinu

Myší monoklonální buněčná linie, sekretující antilymfotoxin (příklad 8), byla vyčištěna od kapaliny ascitu chromatografií na iontoměničích. Eluát z anxy byl zpracován se Sepharosou, aktivovanou bromkyanem v koncentraci 2 mg/ml pryskyřice. Kolona o objemu 20 ml byla ekvilibrována postupně TBS (obsahujícím 0,05 M Tris-HCl, pH 7,0, 0,15 M chloridu sodného a 2 mM ethylendiaminetetraoctové kyseliny), potom eluována pufrém (obsahujícím 0,1 M kyseliny octové, pH = 4,5, 150 mM chloridu sodného) s konečně TBS. Sraženina, která se získá vysrážením (40% nasyceným síranem amonným) sonikovaného lyzátu *E.coli*, transformované pLTtrpl (předem vyčištěného odstředováním), se suspenduje v 0,1 M Tris-HCl, pH 7,4 a 5 mM ethylendiaminetetraoctové kyseliny a naplní se do kolony rychlostí jeden objem kolony za jednu hodinu. Následuje intenzivní promývání TBS, který obsahuje 0,05 % Tweenu 80. Elucí pufrém se eluoval specificky navázaný materiál. Okamžitě bylo upraveno pH na hodnotu 7,8 přidáním 0,1 objemu 1M Tris-HCl, pH 8,5, a roztok skladován při 4 °C. Specifická aktivita takto vyčištěného lymfotoxinu byla 2 až 10.10⁷ jednotek/mg (měřeno shora uvedeným testem na myším L-929).

Eluát, který obsahoval největší část aktivity, byl nanesen na kolonu. Většina proteinu byla eluována jako jediný pás za jak redukujících, tak neredukujících podmínek elektroforézou na SDS-polyakrylamidovém gelu. Pohyblivost tohoto pásu odpovídá molekulová hmotnosti přibližně 18 000, což je v souladu s předpověděnou hodnotou 18 664 pro neglykosylovaný lymfotoxin s leucylovou skupinou na aminovém konci podle odvozené aminokyselinové sekvence. Pro další charakterizování jeho biologické účinnosti byl vyčištěný rekombinantní lymfotoxin testován in vitro na cytolytickou účinnost a in vivo na protinádorovou účinnost.

Příklad 5

Biologická účinnost rekombinantního lymfotoxinu in vivo

Rekombinantní a lymfoblastoidní lymfotoxin byl testován testem nekrózy nádoru in vivo. Sarkomy MethA(a) byly kultivovány 7 až 10 dnů v přecitlivělých myších [BLAB/c x 057B1/6fl nebo CD6fl]. Přímě do nádorů byl pak injekčně podán lymfotoxin z příkladu 4, lymfoblastoidní lymfotoxin (připravený a vyčištěný jak shora popsáno) nebo kontrolní vzorek. Po 20 až 24 hodinách byly myši usmrceny, nádory odstraněny a histologicky zjištěn rozsah nekrózy. Jak je uvedeno v tabulce 1, jak rekombinantní, tak lymfoblastoidní lymfotoxin způsoboval značnou nekrózu sarkomu MethA(a) in vivo. Kontrolní vzorky nezpůsobovaly nekrózu sarkomů MethA(a).

Tabulka 1

Nekróza sarkomu MethA(a) in vivo působením rekombinantního a přírodního lymfotoxinu				
podáváno:	počet myší s nekrózou sarkomu			
	+++	++	+	-
kontrolní pufr 1	-	-	-	3
lymfoblastoidní lymfotoxin 25 000 jednotek	4	-	-	-
lymfoblastoidní lymfotoxin 10 000 jednotek	4	-	-	-
rekombinantní lymfotoxin 200 000 jednotek	14	2	2	-
rekombinantní lymfotoxin 25 000 jednotek	3	-	-	1
rekombinantní lymfotoxin 10 000 jednotek	3	-	1	-
kontrolní pufr 2	-	-	-	9

- 5 Lymfoblastoidní lymfotoxin byl podáván injekčně rozpuštěný v pufru 1 (0,001 M Tris-HCl, 0,05 M uhlíčitanu amonného, pH 8,0). Rekombinantní lymfotoxin byl podáván injekčně rozpuštěný v pufru 2 (0,15 M chloridu sodného, 0,1 M octanu sodného a 0,1 M Tris-HCl o pH 7,8).
- 10 Zdá se, že nepřítomnost cukru na rekombinantním lymfotoksinu neovlivňuje biologickou účinnost, jelikož specifická účinnost lymfotoksinu, produkovaného rekombinantní kulturou (2 až $10 \cdot 10^7$ jednotek na mg), je přibližně stejná jako u lymfoblastoidního lymfotoksinu ($4 \cdot 10^7$ jednotek na mg).
- 15 Účinnost rekombinantního lymfotoksinu je termolabilní, podobně jako účinnost přírodního lymfotoksinu, tj. po zahřátí jednu hodinu na 80 °C dochází k inaktivaci vodného roztoku.

Příklad 6

20

Konstrukce expresního vektoru pro lymfotoxin s methionylovou a histidylovou skupinou na aminovém konci

- 25 Konstrukce plazmidu, která řídí expresi lymfotoksinu s methionylovou a histidylovou skupinou na aminovém konci v *E.coli*, je znázorněna na obrázku 3. Syntetický oligonukleotid byl vložen do expresního plazmidu tak, aby kódoval iniciační methioninový kodón, přilehlý k histidylovému kodónu lymfotoksinu s histidylovou skupinou na aminovém konci (zbytek 24 na obrázku 2a). Ten byl získán izolací vektorového fragmentu o 4630 párech nukleotidů z plazmidu pLTtrpl štěpením XbaI a ClaI, preparativní elektroforézou na 1% agarosovém gelu a elektroelucí. BamHI-ClaI
- 30 fragment o 570 párech nukleotidů, který obsahuje většinu sekvence, kódující lymfotoxin, byl také izolován z plazmidu pLTtrpl stejným způsobem. Způsoby shora uvedenými byly syntetizovány dva syntetické oligonukleotidy a smíchány s oligonukleotidy 6, 7, 52 a 53 z obrázku 1a. Přibližně 50 pmol každého oligonukleotidu bylo zpracováno s polynukleotid-kinázou, jak je to popsáno v příklad 1. Oligonukleotidy byly anelovány a potom ligovány se směsí BamHI-ClaI fragmentu o 570 párech nukleotidů a XbaI-ClaI vektorového fragmentu
- 35 o 4630 párech nukleotidů. Ligační směs byla transformována do *E.coli* ATCC 31446. Rekombinanty byly vybrány na základě rezistence na tetracyklin. Plazmid p20KLT byl izolován z jednoho z transformantů. Plazmid p20KLT byl charakterizován restričním enzymem a sekvenční analýzou DNA.

40

Příklad 7

Příprava cytotoxické lymfotoxinové napojené varianty

5

Plazmid, který obsahuje DNA, kódující napojení lymfotoxinu na bakteriální protein, byl zkonstruován klonováním sekvence, která kóduje bakteriální signální sekvenci, přilehlou k strukturnímu genu lymfotoxinu. Byla charakterizována sekvence genu tepelně stabilního enterotoxinu II (ST II) z *E.coli* [R. N. Picken a spol.: *Infection and Immunity* 42, 269 až 275 (1983).]. Sekvence kóduje signální sekvenci o 23 aminokyselinách, která řídí sekreci STII do periplazmového prostoru *E.coli*.

10

Plazmid pWM501 [Picken a spol.: *Infection and Immunity* 42(1), 269 až 275 (1983).] obsahuje gen tepelně stabilního enterotoxinu (STII). Část DNA, která kóduje gen STII, byla izolována z plazmidu pWM501 následujícím postupem: Plazmid pWM501 se rozštěpí působením *RsaI*. Izoluje se framnet DNA o 550 párech nukleotidů. Tento fragment se liguje s fágem M13mp8 [J. Messing a spol.: *Third Cleveland Symposium on Macromolecules: Recombinant DNA*", ed. A. Walton, Elsevier, Amsterdam, str. 143 až 153 (1981).], který byl před tím rozštěpen působením *SmaI*. Ligovaná DNA se použije pro transformaci *E.coli* JM101, komerčně dostupného kmene pro použití s fágem M13. Izolují se jasné plaky. Z *E.coli* JM101, infektované tímto fágem, se standardními postupy [J. Messing a spol.: viz citace] izoluje dvouvláknový M13mp8 STII *Rsa* derivát. Použitím právě popsaného subklonování M13mp8 se nyní pomocí míst různých restrikčních endonukleáz naváže fragment o asi 550 párech nukleotidů, který obsahuje signální gen STII. Derivát M13mp8 STII *Rsa* se pak rozštěpí působením *EcoRI* a *PstI*. Izoluje se tak DNA fragment nepatrně větší než 550 párů nukleotidů.

15

20

25

Fragment *EcoRI*-*PstI* byl subklonován do plazmidu pBR322. To bylo provedeno tak, že plazmid pBR322 byl rozštěpen působením *EcoRI* a *PstI*. Izoluje se vektor. Tento izolovaný vektor byl ligován s *EcoRI*-*PstI* fragmentem DNA. Tato směs DNA se použije pro transformaci *E.coli* ATCC 31446. Vyberou se kolonie, které jsou rezistentní na tetracyklin. Plazmid byl izolován z rezistentní kolonie *E.coli* a označen jako částečný pSTII.

30

Částečný pSTII se rozštěpí účinkem *MnII* a *BamHI*. Byly izolovány: fragment o 180 párech nukleotidů, obsahující STII Shine-Dalgarno sekvenci, signální sekvenci STII a prvních 30 kodonů maturovaného genu STII. Fragment o 180 párech nukleotidů se liguje s plazmidem, který obsahuje *trp* promotor. Jeden takový plazmid, plazmid pHGH207-1, byl již dříve v literatuře popsán [H. de Boer a spol.: "Promotors: Structure and Function", ed. R. Rodriguez a spol.; Chamberlin, Praeger Pub., New York, NY, str. 462 až 481 (1982).]. V tomto případě byl použit derivát tohoto plazmidu, plazmid pHGH207-1⁺, v němž *EcoRI* místo 5' k *trp* promotoru bylo převedeno na *EcoRI*⁺ doplněním DNA polymerázou I (DNA polI) a připojením zarovnaných konců ligací [S. Cabilly a spol.: *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 81, 3273 až 3277 (1984).]. Plazmid, který obsahuje *trp* promotor, byl rozštěpen působením *XbaI*, zpracován s DNA polI a čtyři dNTP doplnily přečnívající sekvenci. DNA preparát byl rozštěpen působením *BamHI*. Izoluje se fragment, který obsahuje vektor. Tento vektorový fragment se pak liguje se shora izolovaným DNA fragmentem, který obsahuje signál STII o 180 párech nukleotidů. Ligační směs se použije pro transformaci *E.coli* ATCC 31446 na ampicilinovou rezistenci. Plazmid, který je označen jako signál STII (STII-leader), se izoluje z kolonie, rezistentní na ampicilin.

35

40

45

Fág M13, který obsahuje sekvence, kódující STII, se nejdříve zkonstruuje ligací fragmentu *XbaI*-*BamHI* o 180 párech nukleotidů ze signálu pSTII do m13mp10, rozštěpeného působením *XbaI* a *BamHI*. Výsledná fágová DNA, pSTII-pro více hostitelů, byla charakterizována analýzou restrikčními endonukleázami a sekvenováním nukleotidů. LT kódující sekvence byly pak zavedeny do tohoto vektoru ligací fragmentu *HpaI*-*EcoRI* o 700 párech nukleotidů z pLTtrpI s replikativní formou (RF, dvouvláknová) DNA pSTII pro více hostitelů, štěpené *SmaI*-*EcoRI*.

50

Obě místa SmaI i HpaI mají zarovnané konce a jsou spolu ligována (z toho vyplývá ztráta obou míst). Výsledná fágová DNA, M13-STII-LT, se charakterizuje a pak se použije pro mutagenезi následujícím způsobem: primer 5' p CAAATGCCTATGCACTGCCAGGCGTAGG se zpracuje s kinázou, za přítomnosti ligasového pufru se smíchá s templátem (M13-STII-LT) a M13mp10 RF DNA, rozštěpenou působením XbaI-EcoRI [pro podporu primeru jak popisuje J. P. Adelman a spol.: DNA 2, 183 až 193 (1983).]; směs se zahřeje na 95 °C, nechá se anelovat třicet minut za teploty místnosti a pak se umístí na třicet minut na led. Potom se přidají všechny čtyři deoxynukleotid-trifosfáty spolu s ATP, T4 DNA ligázou a velkým fragmentem (Klenowovým fragment) *E.coli* DNA polymerázy I. Směs se inkubuje jednu hodinu při 14 °C. Pak se použije pro transfekci kompetentní *E.coli* JM101, komerčně dostupného kmene, nebo jiného hostitele fágu M13. Správně hybridizovaný fág byl identifikován hybridizačním testováním za použití primeru, označeného ³²P, jako sondy. Výsledný fág ST-LT-mut byl charakterizován sekvenční analýzou DNA. Z tohoto fágu se připraví replikativní forma DNA. Ta se použije pro izolaci DNA, obsahující fragment XbaI-EcoRI o 761 páru nukleotidů pro signální sekvenci STII, přilehlou ke kódující sekvenci lymfotoxinu s leucylovou skupinou na aminovém konci. Tato DNA se liguje s p20KLT, rozštěpeným působením XbaI a BamHI (velký vektorový fragment o 4285 párech nukleotidů), a fragmentem plazmidu pBR322, rozštěpeným působením EcoRI a BamHI (o 375 párech nukleotidů). Výsledný plazmid pST18LT byl charakterizován restrikcí zmapováním a sekvenací DNA. Podobná konstrukce se připraví tak, že se zakóduje napojení STII signálu na aminovém konci na histidinový zbytek lymfotoxinu s histidylovou skupinou na aminovém konci. Výsledné plazmidy se transformují do *E.coli* ATCC 31446. Izolují se plazmidy pSTLT18 a pSTLT16. Analýzou restrikcími enzymy a dideoxy-sekvenací bylo potvrzeno, že kódují napojení STII. *E.coli*, transformovaná plazmidem pSTLT18 nebo pSTLT16, syntetizuje napojení signální sekvence STII a lymfotoxinu s leucylovou skupinou na aminovém konci a s histidylovou skupinou na aminovém konci, což je v souladu s vypočtenou molekulovou hmotností (podle gelové elektroforézy). *E.coli* lyzáty, které obsahují toto napojení peptidů, vykazují cytotoxickou aktivitu.

30 Příklad 8

Způsob přípravy monoklonální myší protilátky, schopné neutralizovat lymfotoxin

Vyčištěný lymfoblastoidní lymfotoxin, který se získá v příkladu 1, se dialyzuje proti solnému roztoku, pufovanému fosforečnanem (PBS). Dialyzát obsahoval 200 µg lymfotoxinu na ml. K dialyzátu se přidá tolik glutaraldehydu, aby jeho koncentrace byly 70 mM. Směs se inkubuje 2 h za teploty místnosti, přidá se další glutaraldehyd do koncentrace 140 mM a v inkubaci se pokračuje dalších 6 hodin. Směs se pak dialyzuje proti PBS. Směs 50 µg lymfotoxinu, zkříženě navázaného na glutaraldehyd (zde nazývaný "polylymfotoxin"), a 0,5 ml Freundova úplného adjuvantu se podá injekčně myším (kmen BALB/c). Po 1 týdnu byly myši imunizovány druhou injekcí, obsahující 50 µg polylymfotoxinu a 0,5 ml Freundova neúplného adjuvantu, polovina byla podána intramuskulárně, druhá polovina do peritoneální kavity. Po sedmi dnech bylo izolováno sérum. Sérum se testuje na antilymfotoxinovou účinnost testem ELISA. Test ELISA se provádí následujícím způsobem: Pufovaný roztok vyčištěného lymfotoxinu se umístí do mikrotitrovacích jamek. Každá jamka se pokryje asi 100 ng lymfotoxinu. Roztok, který se neadsorbuje do jamek, se odebere. Příslušné zředěný testovaný roztok (50 µl) se spojí 100 µl PBS, který obsahuje 5 mg/ml hovězího sérumalbuminu (PBS-BSA pufr), směs se přidá do každé jamky, inkubuje se dvě hodiny za teploty místnosti, promyje se PBS, obsahujícím 0,05 % Tweenu 20, do každé jamky se přidá 100 µl křenuvovou peroxidázou označeného antiomyšího kožího IgG v PBS-BSA pufru a inkubuje se jednu hodinu. Každá jamka se promyje PBS, který obsahuje 0,05 % Tweenu 20, potom se do každé jamky přidá citráto-fosforečnanový pufr (pH 5), obsahující 0,1 mg o-fenylendiaminu na ml (substrátový roztok), a vodný 30% peroxid vodíku [v dávce 4 µl 30% peroxidu vodíku (objemové díly) na 10 ml substrátového roztoku]. Jamky se

inkubují třicet minut. Reakce se zastaví přidáním 50 μ l 2,5M kyseliny sírové. Změří se absorbance při 492 nm. Jamky, které vykazují absorbanci větší než 1 (optická hustota), byly považovány za účinné proti lymfotoxinu.

- 5 Testované vzorky byly testovány také na schopnost neutralizovat cytolytickou aktivitu lymfotoxinu v testu na myších L 929. Sérum, které se získá z imunizovaných zvířat nebo hybridomových supernatantů, se zředí (podle potřeby) médiem RPMI-1640, které obsahovalo 10 % fetálního (plodového) hovězího séra a asi 100 lymfotoxinových jednotek na mililitr a vyseje se do mikrotitrovacích jamek, které obsahují kultivované buňky L929, jak je obvyklé
10 v cytolytických testech. U kontrolních byly všechny buňky lyzovány. Neutralizující protilátka byla prokázána tím, že nedošlo k lyzi buněk L929 účinkem lymfotoxinu.

- U zvířat, která byla imunizována lymfotoxinem, zpolymerovaným s glutaraldehydem, došlo ke zvýšení protilátek, které byly aktivní v testu ELISA. Nebylo však zjištěno žádné sérum, které by
15 mělo neutralizující účinnost.

- Pro imunizace stejných myší byla použita suspenze, která obsahuje 100 μ g lymfotoxinu a 1 ml 1,64% (hmotností díly : objemovým dílům) suspenze hydroxidu hlinitého. Myším bylo injekčně podáno 100 μ l suspenze intramuskulárně a 400 μ l intraperitoneálně. Po jednom týdnu bylo
20 myším intravenózní injekcí podáno 10 μ g nezpolymerovaného a neadsorbovaného lymfoblastoidního lymfotoxinu ve 100 μ l pufru PBS. Testováním zvířecího séra (se zředěním 1/80) o tři dny později byla prokázána přítomnost protilátky, neutralizující lymfotoxin. Těmto zvířatům byly odebrány sleziny. $3 \cdot 10^7$ buněk sleziny se spojí s $5 \cdot 10^7$ buněk myšího myelomu a vysejí se do mikrotitrovacích jamek, které obsahují médium HAT a asi 3000 peritoneálních makrofágů na
25 mikrotitrovací jamku, podle postupu, popsaného S. Fazekasem a De St. Grothem: J. Immunol. Methods 35, 1 až 21 (1980). Hybridomy ze supernatantu jamek, které byly pozitivní ve shora uvedeném testu ELISA, byly kultivovány v 1 ml média DMEM s 20 % fetálního telecího séra, 10 % média NCTC-135, $3 \cdot 10^{-5}$ M β -merkapt ethanolu a HAT, rozděleny do mikrotitrovacích jamek podle statistického průměru jedna buňka na jamku a kultivovány v jednom nebo pěti
30 mililitrech stejného média. Supernatanty se po kultivaci testují na neutralizující protilátku. Neutralizující protilátka byla syntetizována asi 2 % (statisticky) hybridomy (pozitivními v testu ELISA) z imunizace hydroxidem hlinitým. Z této skupiny hybridomů se popřípadě vybere protilátka s vysokou afinitou na lymfotoxin.

35

Příklad 9

Místně specifická mutagenese lymfotoxinu

- 40 V tomto příkladu se postupuje přesně podle způsobu z příkladu 3 s tím, že segment 6 syntetického oligonukleotidu byl modifikován tak, že obsahuje sekvenci 5' CTCAACTCTGCACCCA 3' a jeho doplňkové vlákno (segment 53) bylo modifikováno na sekvenci 3' AGACGTGGGTCGTCGT 5'. Modifikované oligonukleotidy se anelují se zbývajícími oligonukleotidy a pak se ligují do expresního vektoru způsobem, popsaným
45 v příkladu 6. Tento vektor obsahuje substituce 2 párů nukleotidů, které změnily lysin+28 v kodónu na histidin. Po transformaci *E.coli* 31446 dojde k expresi histidinového mutantu.

- Jiné místně řízené mutanty se připravují stejným způsobem, s výhodou se vyberou kodóny tak, aby se nezavedlo EcoRI restriční místo, které by vyžadovalo pro štěpení pLTXB1 v příklad 3
50 částečné rozštěpení působením EcoRI. Mutací by se také neměla zavádět další XbaI nebo BamHI místa do fragmentu A (viz obrázek 1b), BamHI nebo HindIII místa do fragmentu B nebo Hind III či BglII místa do fragmentu C. Pro patřičně sestavení mutantu pLTXB1 jsou potřebná jiná

částečná štěpení; štěpením se získají spíše deleční mutanty (tj. mutanty s delecemi) než substituční mutanty (tj. mutanty se substitucemi), které jsou cílem v tomto případě.

5 Příklad 10

Identifikace genomové DNA, kódující myší a hovězí lymfotoxin.

Sekvence aminokyselin myšího a hovězího lymfotoxinu

10

Geny myšího a hovězího lymfotoxinu byly izolovány z bank genomových λ . Fragment cDNA lidského lymfotoxinu (PvuII-EcoRI o 600 párech nukleotidů) se označí ^{32}P zářezovou translací a použije se jako sonda pro hledání v bance myší genomové DNA [kmen M 600 myší genomové DNA λ Charon4A, T. Maniatis a spol.: Molecular Cloning, 31 (1982).] a nezávisle v bance hovězích genomových DNA (evropský patent 68622A). Hybridizace se provádí za nízké selektivity ve 20% formamidu [Gray a Goeddel: Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 80, 5842 až 5846 (1983).]. Filtry byly promyty dvakrát vodným roztokem 0,03M chloridu sodného, 0,03M citranu sodného a 0,1% SDS. Přes jednotlivé plaky bylo vyčištěno několik fágů, hybridizovaných sondou lidského lymfotoxinu [T. Maniatis a spol.: Cell 15, 687 až 701 (1978).], která byla štěpena restričními endonukleázami a analyzována Southernovou hybridizací. EcoRI fragment myší DNA o 3500 párech nukleotidů a EcoRI fragment hovězí DNA o 2200 párech nukleotidů byly hybridizovány sondou lidského lymfotoxinu. Tyto fragmenty DNA se klonují do plazmidu pBR322 a pak se sekvenují podle A. J. H. Smith: Methods in Enzymology 65, 560 až 580 (1980). Na obrázku 4 je uvedena odvozená proteinová sekvence myšího a hovězího lymfotoxinu; pro srovnání je uvedena také sekvence lidského lymfotoxinu.

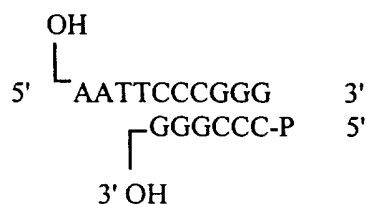
25

Příklad 11

30 Exprese lymfotoxinu v kvasinkách za regulace ADH promotorem

Plazmid pLTtrpI se rozštěpí působením XbaI. Tím se plazmid otevře v místě XbaI, které se nachází právě vedle iniciačního kodónu lymfotoxinu. Kohezivní konec XbaI se zarovná Klenowovým fragmentem *E.coli* DNA polymerázy I se čtyřmi dMTP. K zarovnanému fragmentu plazmidu se liguje EcoRI adaptor

35



40

a přečnívající 5' hydroxylový konec se fosforyluje polynukleotid-kinázou. Ligační směs se použije k transformaci *E.coli* ATCC 31446 a plazmidu pLTtrpIRI, který podle restriční analýzy obsahuje další místo EcoRI vedle počátečního (iniciačního) kodónu lymfotoxinu. Izoluje se plazmid pLTtrpIRI, ten se rozštěpí působením EcoRI a izoluje se fragment SP, který obsahuje DNA lymfotoxinu.

45

Plazmid pFRPn (evropský patent 60057A) se působením EcoRI rozštěpí, pro zabránění recirkularizace se zpracuje s alkalickou fosfatázou, liguje se na fragment SP lymfotoxinu (za použití T4 DNA ligázy) a ligační směs se použije pro transformaci *E.coli* ATCC 31446. Kolonie, které jsou rezistentní na ampicilin, poskytl 2 série plazmidů s SP inzerty s opačnými

50

orientacemi, jak ukazuje restriční analýza elektroforézou na agarosových gelech. Plazmidy se vyčistí od *E.coli* transformantů a použijí se pro transformaci kvasinek s *trp1* mutací (například kvasinkový kmen RH218) (tento kmen je volně uložený v ATCC č. 44076) na fenotyp *trp*⁺. Bylo nalezeno, že plazmidy orientované tak, že iniciační kodón segmentu SP je umístěn vedle fragmentu promotoru alkohol-dehydrogenázy, transformují kvasinky tak, že dochází k expresi lymfotoxinu. Lymfotoxin se izoluje z extraktů kvasinkových transformantů. Stabilitu plazmidu při fermentaci ve velkém měřítku lze zlepšit tím, že se použije expresní plazmid, který obsahuje dvoumikronový počátek replikace místo pFRPn chromozomálního počátku replikace (*ars 1*), a slučitelný hostitelský kmen [J. Beggs: *Nature* 275, 104 až 109 (1978).].

Příklad 12

Expres lymfotoxinu v savcích buňkách

Fág λ LT11 (příklad 2) se rozštěpí působením *EcoRI*. Izoluje se fragment DNA (reverzní transkript), který obsahuje lymfotoxin. Plazmid pEHER (evropský patent 117060A) se rozštěpí působením *EcoRI*, působí se na něj telecí střevní alkalickou fosfatázou a liguje se s reverzním transkriptem (s *EcoRI*) fágu λ LT11. Výsledné plazmidy, které byly vykultivovány v *E.coli* ATCC 31446 (evropský patent 117060A), se označí pEHERLT I a pEHERLT II. Obsahují DNA lymfotoxinu s opačnou orientací, jak ukazuje restriční analýza na polyakrylamidových gelech. Tyto plazmidy se použijí pro transfekci a selekci buněk CHO DHFR-DUX-B11, CHO1 a Ltk⁻.

Buňky tkáňové kultury se transfektují smícháním 1 µg plazmidu pEHERLT I nebo pEHERLT II, shora připravených, s 10 µg krysí DNA o objemu 250 µl, 0,25 M CaCl₂, přikape se 250 µl pufrovaného solného roztoku HEPES (280 mM chloridu sodného, 1,5 mM hydrogenfosforečnanu sodného, 50 mM HEPES, pH 7,1). Po třiceti minutách za teploty místnosti se tento roztok přidá k buňkám tkáňové kultury, které rostou v 60mm plastických miskách pro tkáňovou kulturu. Používají se buňky CHO 1, CHO DHFR-DUX-B11 a Ltk⁻. Misky obsahují 3 ml kultivačního média, odpovídajícího hostitelské buňce. Pro buňky CHO1 a CHO DHFR-DUX-B11 se jako médium používá Ham F-12 (Gibco) médium, doplněné 10 procenty telecího séra, 100 µl penicilinu na mililitr, 100 µg/ml streptomycinu a 2 nM L-glutaminu. Pro buněčné linie Ltk⁻ se používá Dubelcem modifikované Eaglovo médium (DMEM), doplněné stejným způsobem, jako shora uvedeno. Po 3 až 16 hodinách se médium odstraní. Buňky se promyjí 20% glycerolem v solném roztoku, pufrovaném fosforečnanem. Na každou desku se přidá médium a buňky se inkubují další dva dny.

Výběr (selekce) transfektovaných buněk se provádí trypsinizací buněk po dvoudenní kultivaci (což zahrnuje zpracování buněk s 0,5 mg/ml sterilního trypsinu, který obsahuje 0,2 mg/ml ethylendiaminotetraoctové kyseliny) a přidání asi 3.10⁵ buněk k 10mm deskám tkáňové kultury se selektivním médiem. Pro buňky dhfr⁻ se připraví médium (F-12 GIBCO) bez glycinu, hypoxanthinu a thymidinu (GHT⁻ médium). Pro hostitelské buňky DHFR⁺ se k normálnímu kultivačnímu médiu přidává methotrexát (100 až 1000 nM). Kontrolní pokusy se provádí za podmínek transfekce bez plazmidu a s plazmidem pFD-11 (evropský patent 117060A), obsahujícím normální DHFR. Kolonie, které vzniknou z buněk a které expresí poskytují DHFR plazmid, jsou zřejmé během jednoho až dvou týdnů. Identifikují se transformanty, které expresí poskytují maturovaný lymfotoxin.

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Izolovaný biologicky aktivní lymfotoxin, který obsahuje sekvenci aminokyselinových zbytků 24 až 171 na obrázku 2a, který není glykosylován, nebo má variantní glykosylaci při srovnání s odpovídajícím přírodním lymfotoxinem z lidských lymfoidních buněk.
- 10 2. Izolovaný biologicky aktivní lymfotoxin podle nároku 1, který obsahuje sekvenci s aminokyselinovými zbytky 1 až 171 na obrázku 1.
3. Izolovaný biologicky aktivní lymfotoxin podle nároku 1, který má specifickou aktivitu od 2 do $10 \cdot 10^8$ jednotek na mg proteinu.
- 15 4. Protilátka, která neutralizuje cytolytickou aktivitu lymfotoxinu podle nároku 1 a která neobsahuje neneutralizující protilátky.
5. Protilátka podle nároku 4, která znamená monoklonální protilátku.
- 20 6. Protilátka podle nároku 4 nebo 5, která je značena detekovatelnou látkou.
7. Protilátka podle nároku 6, v němž detekovatelná látka znamená fluorescenční, chemiluminiscenční nebo radioizotopovou značku.
- 25 8. Protilátka podle nároku 4, která je imobilizována na povrchu nebo na matici.
9. Nukleová kyselina, kódující lymfotoxin podle nároku 1.
- 30 10. Nukleová kyselina podle nároku 9, která obsahuje DNA, která neobsahuje intron, přítomný mezi nukleotidy 284 a 285.
11. Nukleová kyselina podle nároku 10, kterou je cDNA.
- 35 12. Nukleová kyselina podle nároku 9, která je kovalentně označena detekovatelnou látkou.
13. Replikovatelný vektor, který obsahuje nukleovou kyselinu podle nároku 9.
14. Replikovatelný vektor podle nároku 13, který je replikovatelný v prokaryotech.
- 40 15. Replikovatelný vektor podle nároku 13, který je replikovatelný v eukaryotech.
16. Replikovatelný vektor podle nároku 14, který dále obsahuje bakteriální promotor, odštěpitelně napojený na nukleovou kyselinu, kódující lymfotoxin.
- 45 17. Replikovatelný vektor podle nároku 14, v němž nukleová kyselina kóduje napojení bakteriálního sekrečního leaderu a lymfotoxinu.
18. Replikovatelný vektor podle nároku 13, v němž vektor znamená pLTrp1.
- 50 19. Replikovatelný vektor podle nároku 13, v němž vektor znamená p20KLT.
20. Heterologní buňka, transformovaná nukleovou kyselinou podle nároku 9.

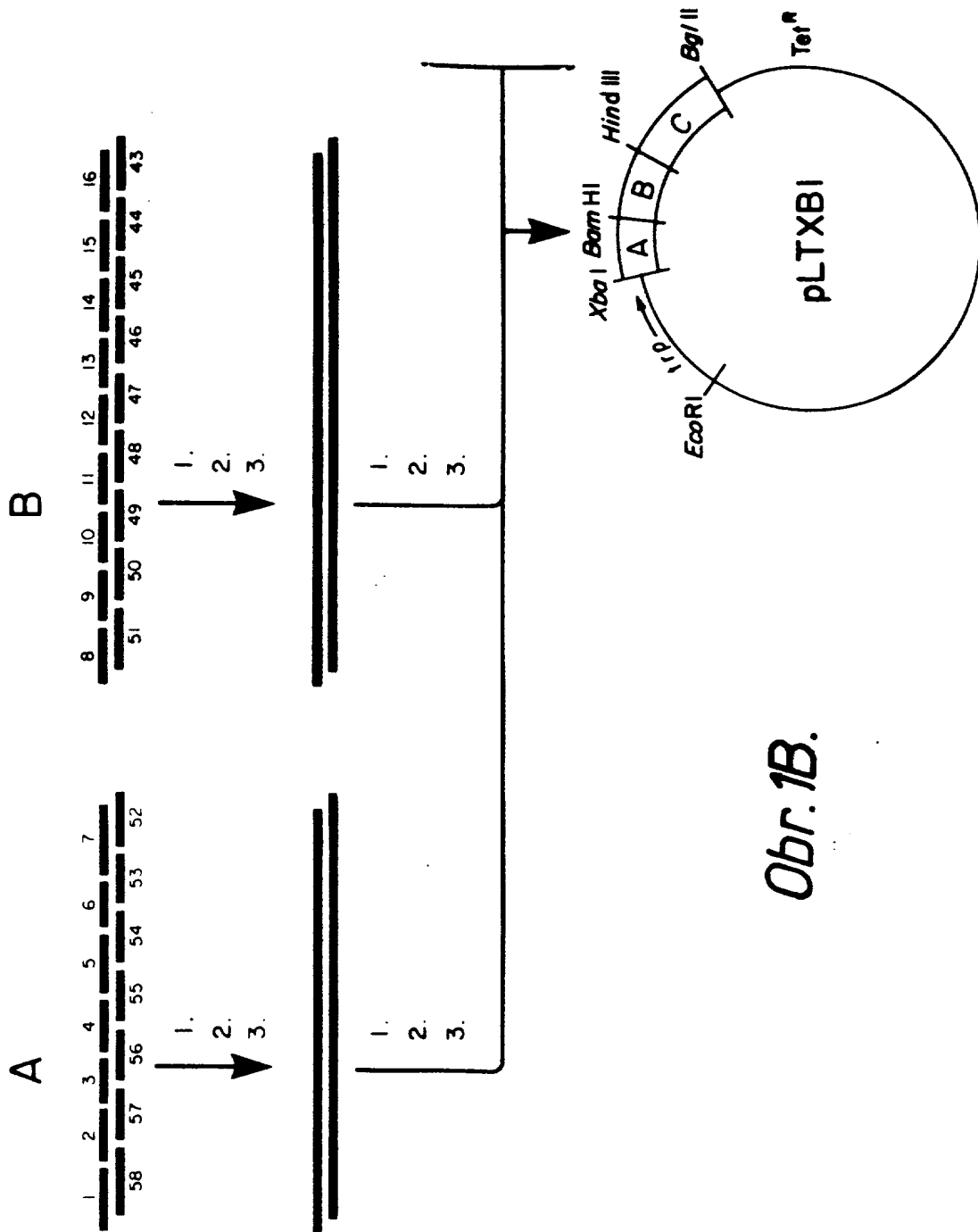
21. Heterologní buňka, transformovaná vektorem podle nároku 13.
22. Buňka podle nároku 21, kterou je prokaryot.
- 5 23. Izolovaný biologicky aktivní variantní lymfotoxin, v němž aminokyselinový zbytek v lymfotoxinové sekvenci podle obrázku 2a je a) vynechán, b) nahrazen jiným zbytkem, nebo c) do sekvence podle obrázku 2a je vložen jiný zbytek s tím, že z tohoto variantního lymfotoxinu je vyloučen lymfotoxin, který má sekvenci podle obrázku 2a s aminovými konci na Leu+1 nebo
10 His+24.
24. Izolovaný biologicky aktivní variantní lymfotoxin podle nároku 23, v němž jsou zbytky -34 až -1 vynechány a který dále obsahuje inzerci alespoň jednoho aminokyselinového zbytku.
- 15 25. Izolovaný biologicky aktivní variantní lymfotoxin podle nároku 24, v němž inserce znamená spojení polypeptidu s karboxylovým koncem lymfotoxinu.
26. Izolovaný biologicky aktivní variantní lymfotoxin podle nároku 25, v němž polypeptid je zapojen na lymfotoxin místem hydrolýzy proteolytickým enzymem.
- 20 27. Izolovaný biologicky aktivní variantní lymfotoxin podle nároku 26, v němž variantní lymfotoxin je cytolyticky neaktivní před proteolytickou hydrolýzou.
28. Izolovaný biologicky aktivní variantní lymfotoxin podle nároku 23, který obsahuje náhradu
25 jednoho aminokyselinového zbytku.
29. Izolovaný biologicky aktivní variantní lymfotoxin podle nároku 23, který obsahuje jednu delecí od 1 do 30 aminokyselinových zbytků.
- 30 30. Izolovaný biologicky aktivní variantní lymfotoxin podle nároku 23, který obsahuje inzerci jednoho aminokyselinového zbytku.
31. Izolovaný biologicky aktivní variantní lymfotoxin podle nároku 23, v němž náhrada znamená náhradu zbytku ze skupiny neutrálních nebo bázičských aminokyselinových zbytků
35 takovým zbytkem, který není členem skupiny, do které patří nahrazená aminokyselina.
32. Izolovaný biologicky aktivní variantní lymfotoxin podle nároku 23, který je cytotoxický.

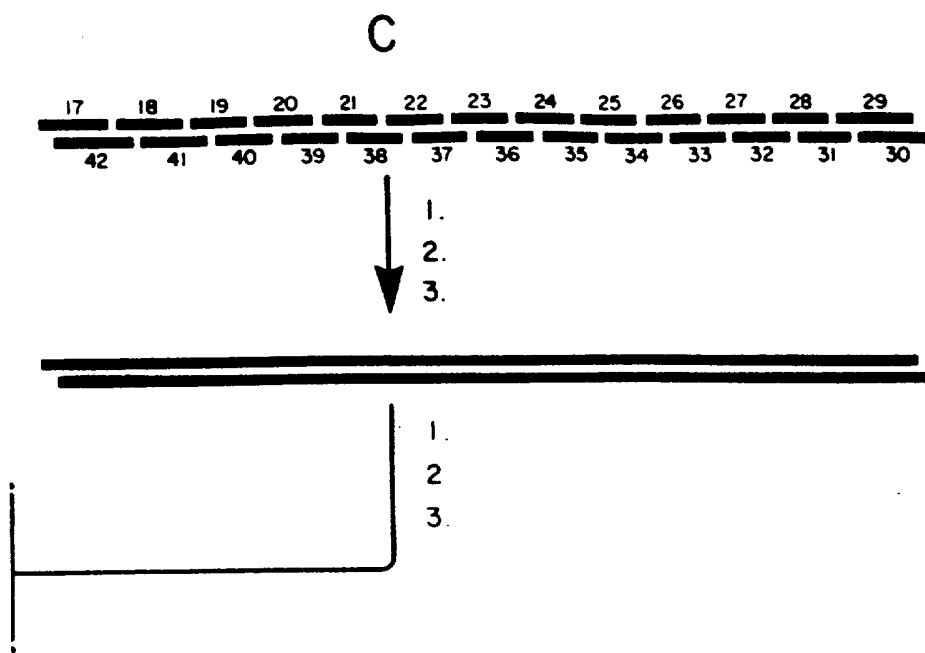
40

16 výkresů

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
 TCTAGAAATTATGCTGCCAGGGGTAGGCTTGACTCCATCTGCAGCACAGACTGCACGCCAGCACCCAAAGATGCACCTGGCACACTCAACTCTGAAGCCAG
 100 AGATCTTAATACGACGGTCCGCATCCAGACTGAGGTAGACGTCGTGCTGACGTGCGGTGCTGGGTTTCTACGTGGACCGTGTGAGTTGAGACTTCGGTC
 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 M
 7 8 9 10 11 12
 CAGCACACCTGATCGGGGATCCATCCAAACAGAACTCCCTGCTGTGGCGCGCAACACCGATCGCGCATTCCTGCAAGATGGCTTCTCCCTGTCCTCAACAA
 200 GTCGTGTGGACTAGCCCCCTAGGTAGGTTTGTCTTGAGGGACGACACCGCGGTTTGTGGCTAGCGCGTAAGGACGTTCTACCGAAGAGGGACAGGTTGTT
 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
 CTCCCTGCTGGTGCCAACTCCGGTATCTACTTCGTATACCTCACAGGTGGTGTCTCCGGTAAAGCTTACTCCCCAAAGGCAACTTCTCCCTCCACTGTAC
 300 GAGGGACGACACCGGTTGAGGGCCATAGATGAGTGTCCACCAAGAGGCCATTTCGAATGAGGGGTTCCGTTGAAAGGAGGGGTGACATG
 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
 CTGGCACACGAGGTGCAACTGTTCTCTCCAGTATCCATTTACGTGCCACTGCTGTCTCCAGAAATGGTGTACCCGGGTCTGCAGGAGCCATGGC
 400 GACCGTGTGCTCCACGTTGACAAGAGGAGGGTATAGGTAAGTGCACGGTGACGACAGGAGGGTCTTTTACCACATGGGCCACGACGTCTCGGTACCG
 35
 PSTI
 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
 TGCACCTCCATGATCACGGTGCAGCATTCAGCTGACTCAGGGTGACAGCTGTGACTCACACTGACGGAATTCATAGATCT
 484 ACGTGAGGTACATAGTCCACGTCGTAAGGTCGACTGAGTCCCAGTGGTGCACAGCTGAGTGTGACTGCTTAAGGTATCTAGA
 30
 BGLII

06r. 1A.





Obr. 1B (pokrač.)

Obr. 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 AACTTGGAAAAATCCAGAAAGAAAAATAATTGATTTCAGACCTTCTCCCATTTCTGCCCTCCATTCTGACCATTTTCAGGGGTGTCACCCACCTC
 700 750

 TCCTTTGGCCATTCCAACAGCTCAAGTCTTCCCTGTATCAAGTCACCGGAGCTTTCAAAGAAGGAATTTAGGCATCCCAAGGGACCCACACTCCCTGAAC
 800 850 EcoRI

 CATCCCTGATGTCGTCTGGCTGAGGATTTCAAGCCTGCTAGGAATTCACAGCCCCAAGCTGTTGGTCTTGTCACCAGCTAGGTGGGGCCTAGATCCA
 900 950

 CACACAGAGGAAGCAGGCACATGGAGGAGCTTGGGGGATGACTAGAGGCAGGGAGGGGACTATTTATGAAGGCCAAAAAATTAAATTATTATTATG
 1000 1050

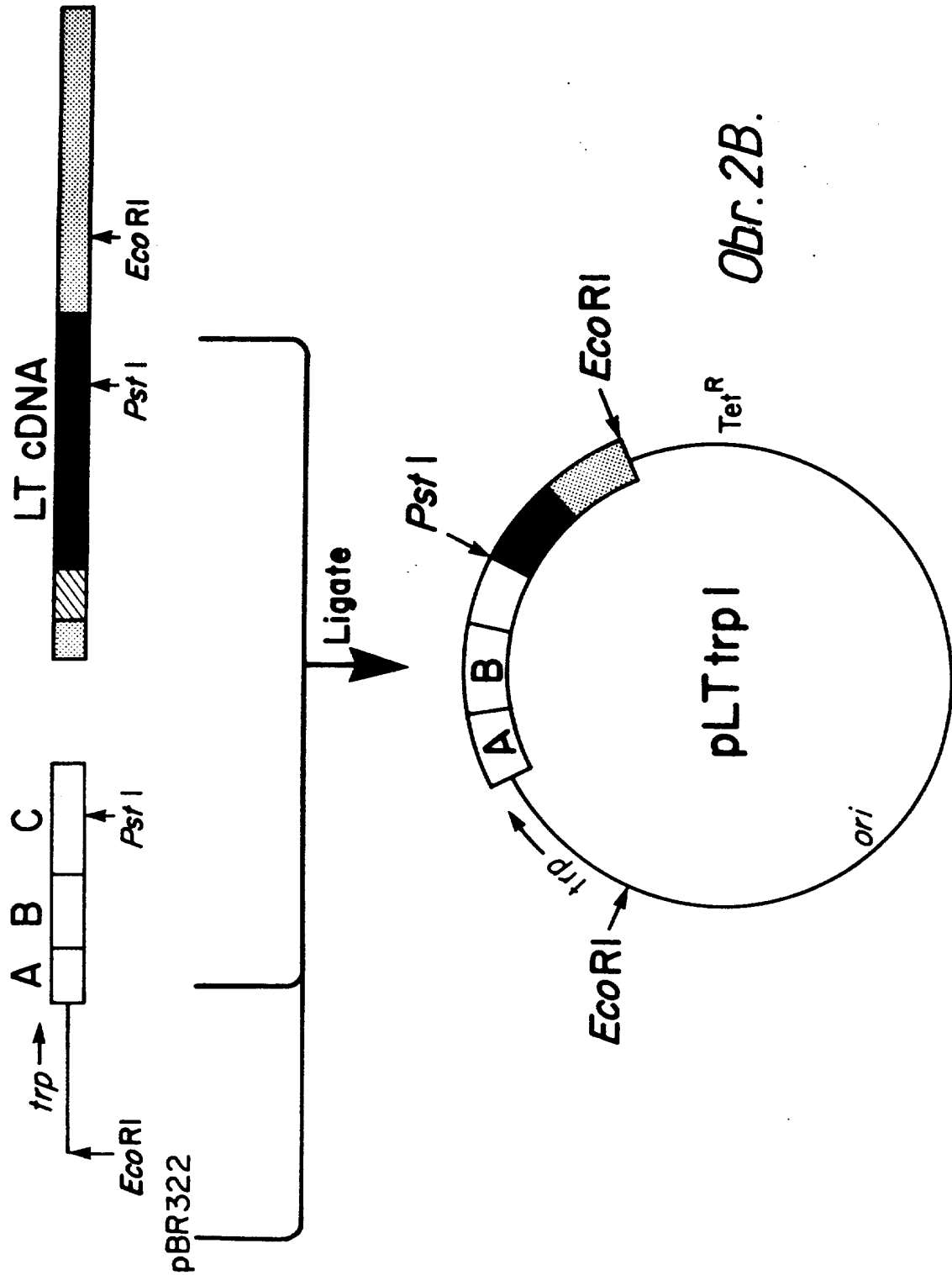
 GAGGATGGAGAGAGGGGAATAATAGAGAACAATCCAAGGAGAAACAGAGACAGGCCCAAGAGATGAAGAGTGAGAGGGCATGCGCACAGGCTGACCAAGA
 1100 1150

 GAGAAAGAAGTAGGCATGAGGGATCACAGGGCCCCCAGAGGCGAGGAAAGGCTCTGAAGCCAGCTGCCGACCAGAGCCCCCACAGGGGCATCTGCACC
 1200 1250

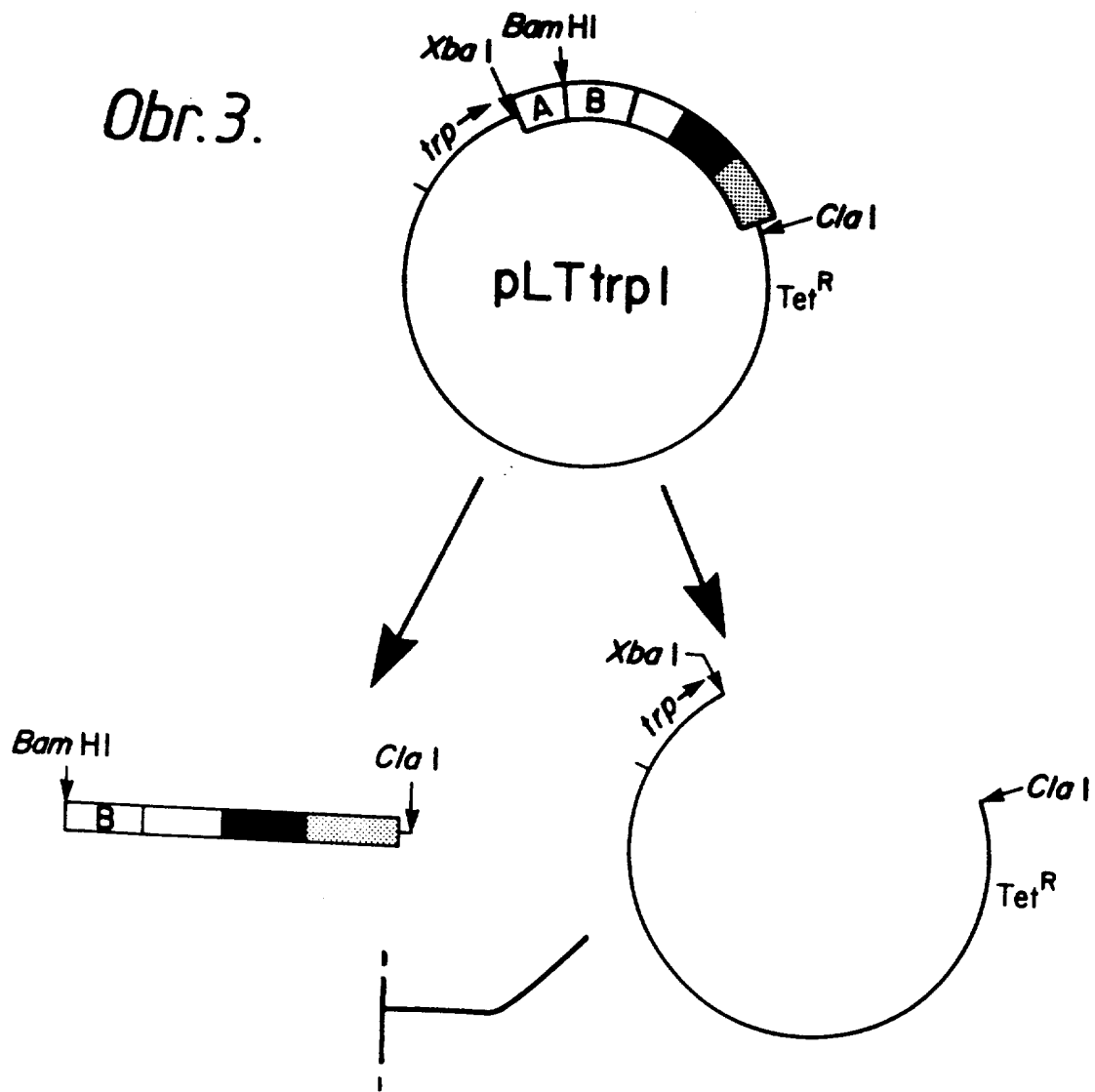
 CTCGATGAAGCCCCAATAAACCTCTTTTCTCTGAAAAAATAAAAAA 3' 1300

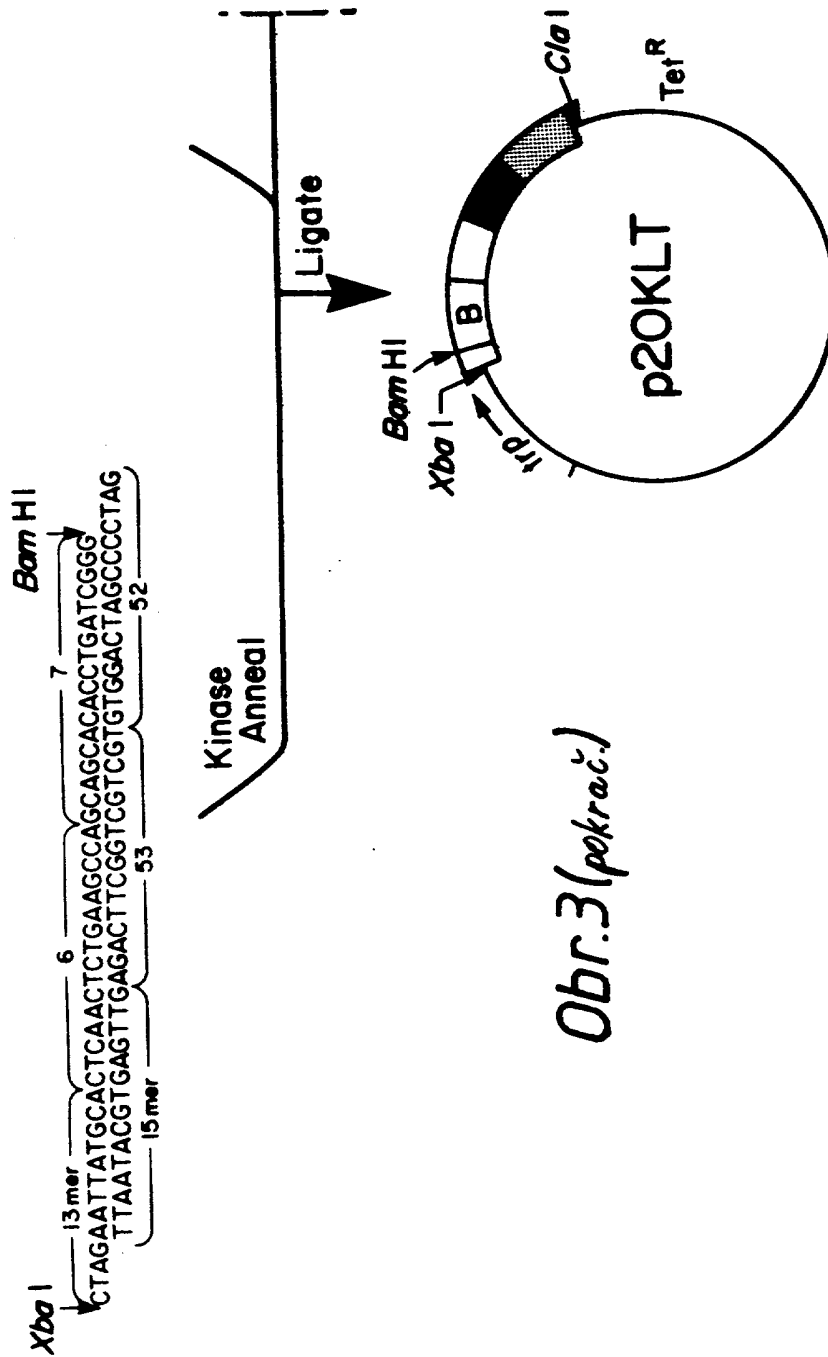
CZ 283148 B6

Obr. 2A (pokrač.)



Obr. 3.





Obr.3 (pokrač.)

[illegible]

Obr. 4 (I)

[illegible]

Obz. 4 (II)

90	SER	PRO	LYS	ALA	THR	SER	SER	PRO	LEU	TYR	LEU	ALA	HIS	100	GLU
	SER	PRO	ARG	ALA	ILE	PRO	THR	PRO	ILE	TYR	LEU	ALA	HIS		GLU
	PHE	PRO	ARG	ALA	THR	PRO	THR	PRO	LEU	TYR	LEU	ALA	HIS		GLU
	PRO	PRO		ALA		PRO				TYR	LEU	ALA	HIS		GLU
	VAL	GLN	LEU	PHE	SER	SER	GLN	TYR	PRO	PHE	HIS	VAL	PRO	LEU	SER
	VAL	GLN	LEU	PHE	SER	SER	GLN	TYR	PRO	PHE	HIS	VAL	PRO	LEU	SER
	VAL	GLN	LEU	PHE	SER	PRO	GLN	TYR	PRO	PHE	HIS	VAL	PRO	LEU	SER
	VAL	GLN	LEU	PHE	SER		GLN	TYR	PRO	PHE	HIS	VAL	PRO	LEU	SER
	SER	GLN	LYS	MET	VAL	TYR	PRO	GLY	LEU	GLN	GLU	PRO	TRP	130	LEU
	ALA	GLN	LYS	SER	VAL	TYR	PRO	GLY	LEU	GLN	GLY	PRO	TRP		VAL
	ALA	GLN	LYS	SER	VAL	CYS	PRO	GLY	PRO	GLN	GLY	ARG	TRP		VAL
		GLN	LYS		VAL	VAL	PRO	GLY		GLN			TRP		
	HIS	SER	MET	TYR	HIS	GLY	ALA	ALA	PHE	GLN	LEU	THR	GLN	GLY	ASP
	ARG	SER	MET	TYR	GLN	GLY	ALA	VAL	PHE	LEU	LEU	SER	LYS	GLY	ASP
	ARG	SER	VAL	TYR	GLN	GLY	ALA	VAL	PHE	LEU	LEU	THR	ARG	GLY	ASP
	SER		TYR			GLY	ALA		PHE		LEU			GLY	ASP

Obr. 4 (III)

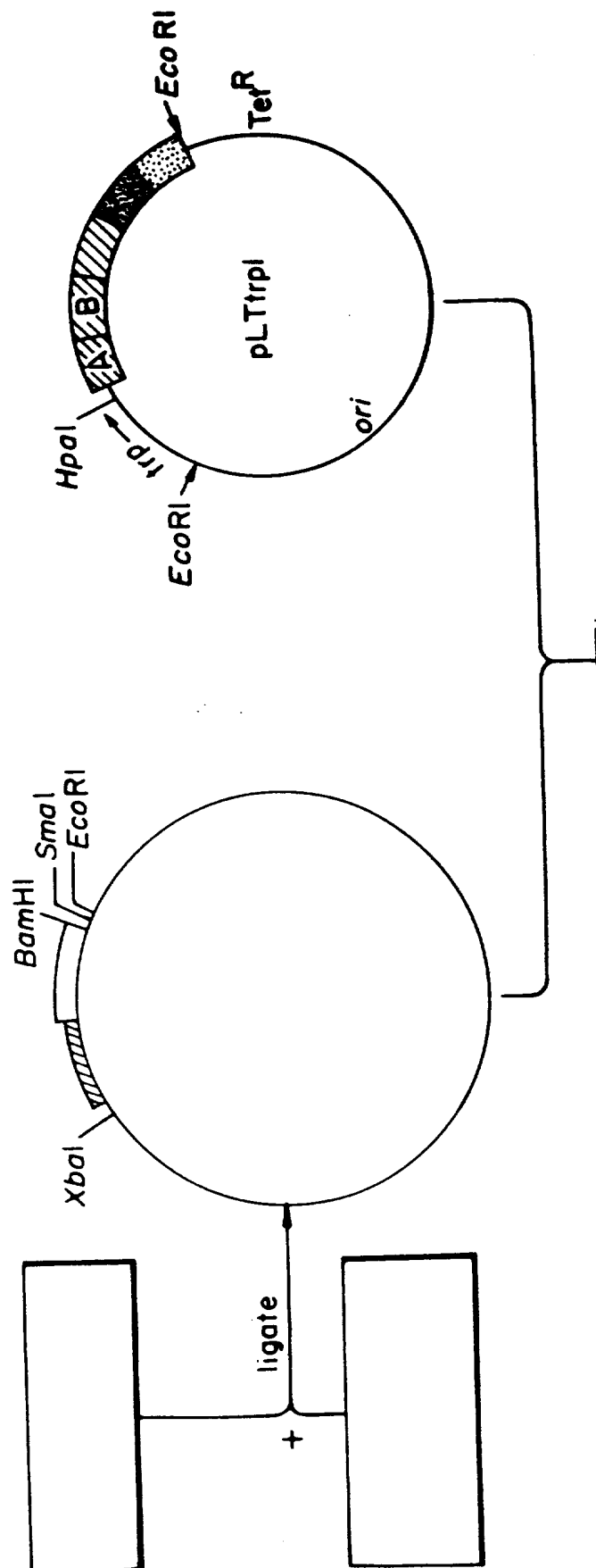
150 LEU SER THR HIS THR ASP GLY ILE PRO HIS LEU VAL LEU SER
 LEU SER THR HIS THR ASP GLY ILE SER HIS LEU HIS PHE SER
 LEU SER THR HIS THR ASP GLY ILE SER HIS LEU LEU SER
 LEU SER THR HIS THR ASP GLY ILE HIS LEU SER

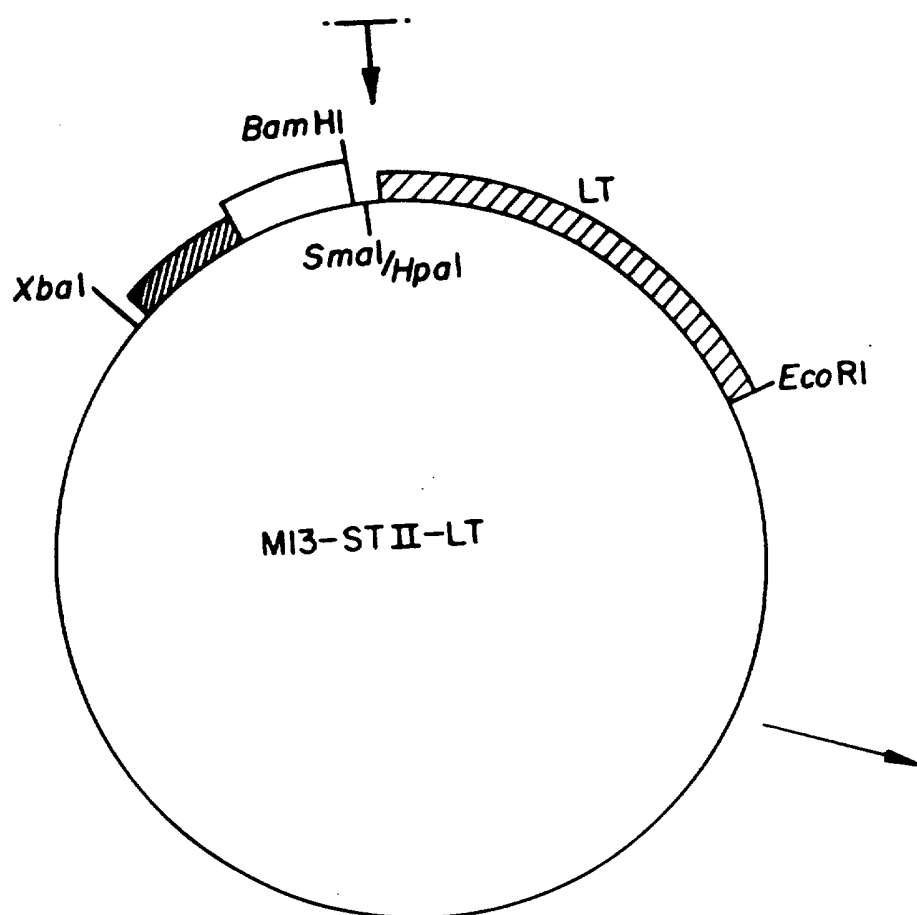
170 PRO SER THR VAL PHE PHE PHE GLY ALA PHE ALA LEU
 PRO SER SER VAL PHE PHE GLY ALA PHE ALA LEU
 PRO SER SER VAL PHE PHE GLY ALA PHE ALA LEU
 PRO SER VAL PHE PHE GLY ALA PHE ALA LEU

2/3248M

Obr. 4 (IV)

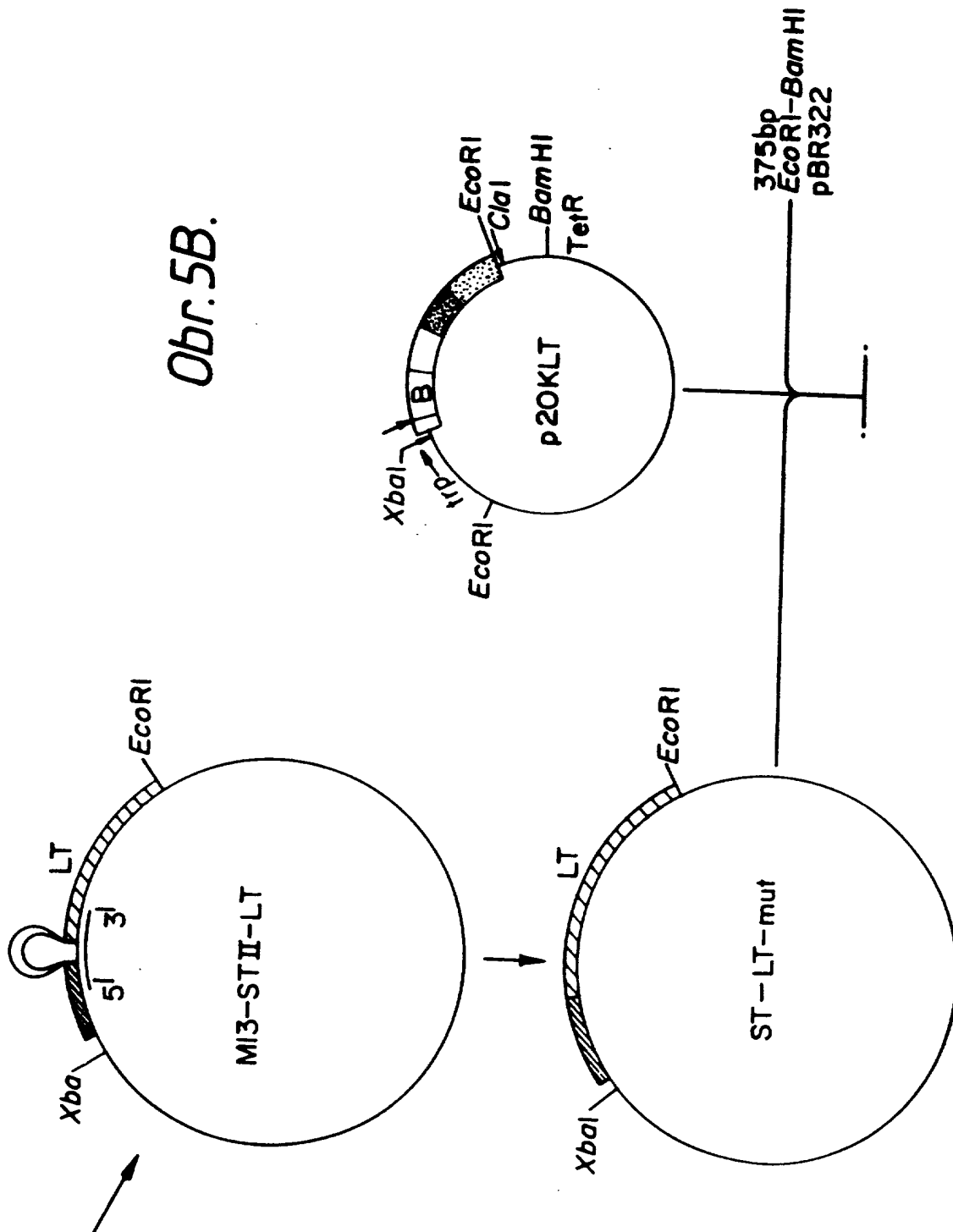
Obr. 5A.

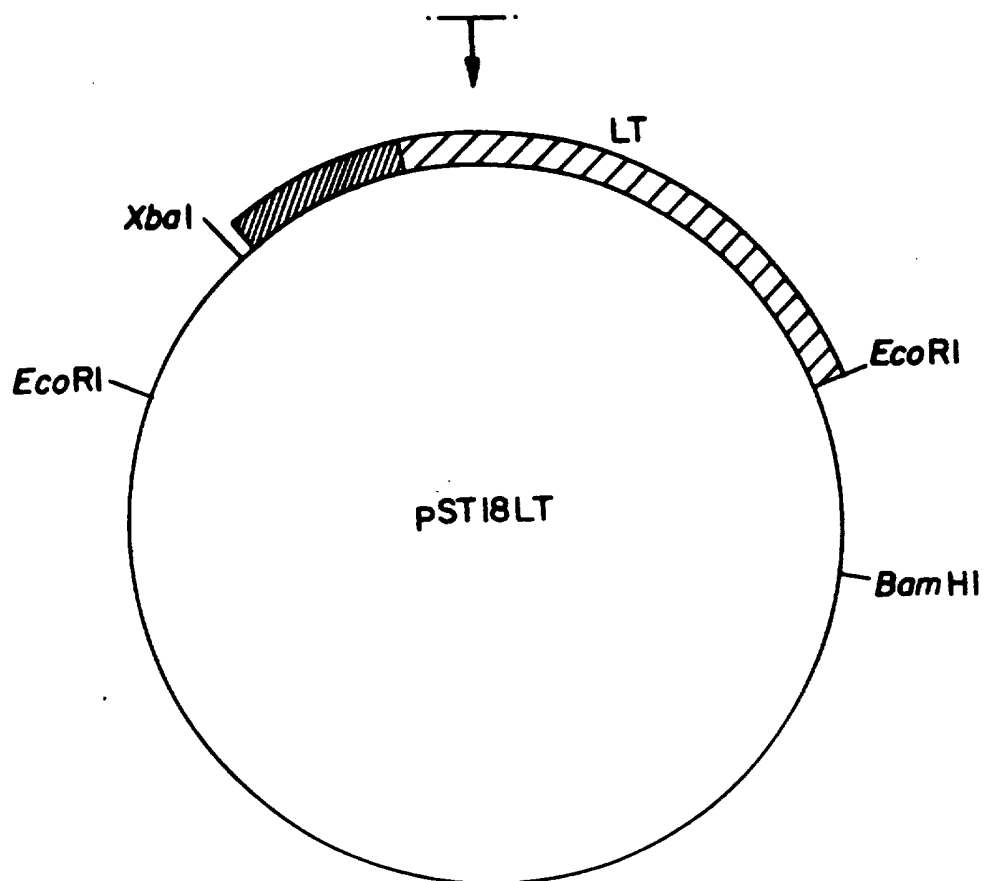




Obr. 5A (pokrač.)

Obr. 5B.





Obr. 5B(pokrač.)

Konec dokumentu
