



(B) (11) **KUULUTUSJULKAISU
UTLAGNINGSSKRIFT**

85867

C (45) Patentti myönnetty
Patent mottolat 10 00 1992

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

C 07K 15/00

(21) Patentihakemus - Patentansökning 854803
(22) Hakemispäivä - Ansökningsdag 04.12.85
(24) Alkupäivä - Löpdag 11.04.85
(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig 04.12.85
(44) Nähtäväsipanon ja kuul.julkaisun pvm. -
Ansökan utlagd och utl.skriften publicerad 28.02.92
(86) Kv. hakemus - Int. ansökan US85/00626
(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet
13.04.84 US 600303 P

S U O M I - F I N L A N D

(F I)

**Patentti- ja rekisterihallitus
Patent- och registerstyrelsen**

(71) Hakija - Sökande

1. Akzo N.V., Velperweg 76, Arnhem, Netherlands, (NL)

(72) Keksijä - Uppfinnare

1. Ransom, Janet H., 17135 Blackrock Road, Germantown, Md., USA, (US)
2. McCabe, Richard P., 204 Currier Drive, Rockville, Md., USA, (US)
3. Haspel, Martin V., 11804 Kemp Mill Road, Silver Spring, Md., USA, (US)
4. Pomato, Nicholas, 1809 Millstream Drive, Frederick, Md., USA, (US)

(74) Asiamies - Ombud: Oy Kolster Ab

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning

**Menetelmä leukoreguliiniksi kutsutulla lymfokiinilla rikastetun valmisteen tuottamiseksi
Förfarande för framställning av ett preparat berikat med en lymfokin kallad leukoregulin**

(56) Viitejulkaisut - Anförda publikationer

(57) Tiivistelmä - Sammandrag

Keksintö koskee leukoreguliinia, biologisesti aktiivista lymfokiiniä, jonka molekyylipaino on noin 120,000-140,000 alayksiköiden molekyylipainon ollessa noin 30,000-35,000, jonka isoelektriset fokusoitumis-pH:t ovat alueella 4,8-5,5 tai 7,5-8,3 ja jolla on kyky säädellä kasvainsolujen fysiologiaa ja kasvua vaikuttamatta haitallisesti normaalisolujen kasvuun. Keksintö koskee myös menetelmiä sen yksitumaisissa soluissa tapahtuvan tuotannon stimuloimiseksi, menetelmiä sen eristämiseksi ja puhdistamiseksi ja menetelmiä sen käyttämiseksi terapeuttisiin tarkoituksiin.

Uppfinningen avser leukoregulin, ett biologiskt aktivt lymfokin med en molekylvikt av ca. 120,000 - 140,000 och med underenheter av ca. 30,000 - 35,000 samt med isoelektriska fokuserings-pH:n mellan 4,8 och 5,5 eller mellan 7,5 och 8,3 och vilket har förmåga av reglera tumör-cellfysiologin och -tillväxten utan att påverka tillväxten av normala celler. Uppfinningen avser även förfaranden för stimulering av dess framställning medelst mononukleära celler, förfaranden för isolering och rening av detsamma och förfaranden för dess terapeutiska användningar.

Menetelmä leukoreguliiniksi kutsutulla lymfokiinilla rikastetun valmisteen tuottamiseksi

5 Tämä keksintö koskee menetelmää ihmisen uuden lymfokiinin valmistamiseksi, jolla on kyky suoraan hajottaa ihmisen kasvainsoluja ja vähentää niiden lisääntymistä sekä lisätä niiden herkkyyttä luontaisten tappajalymfosyyttien välittämälle hajoamiselle. Näitä kasvainten vastaisia vaikutuksia on aiemmin pidetty lymfotoksiinin aikaansaamina. Olemme kuitenkin havainneet, että ihmislymfokiinivalmisteet, joilla on nämä kasvainsolujen vastaiset vaikutukset, ovat biokemiallisesti erotettavissa lymfotoksiinista ja muista aiemmin eristetyistä lymfokiineista interferoni, interleukiinit 1 ja 2 ja makrofageja aktivoiva tekijä mukaan luettuina.

Piirrosten lyhyt kuvaus

20 Kuvat valaisevat leukoreguliinin identifioimista ainutlaatuisiksi ja aiemmin tuntemattomaksi lymfokiiniksi ja osoittavat sen tehon ihmisen kasvainsolujen kasvun hidastamisessa.

Keksinnön tausta

25 Lymfokiineilla, immuunijärjestelmän hormoneilla, on kyky vaikuttaa syövän kehittymiseen, hidastaa kasvainsolujen kasvua ja jopa tuhota kasvaimia. Nämä hormonit ovat glykoproteiineja, niitä tuottavat ja erittävät tietyn tyyppiset imusolut, ja niiden tarkoituksena on vuorovaikutus muiden, spesifisten solujen kanssa. Tiettyjen lymfokiinien tiedetään olevan useamman kuin yhden solutyypin tuottamia ja olevan vuorovaikutuksessa useamman kuin yhden solutyypin kanssa. Niinpä useimpien lymfokiinien vaikutusten tiedetään olevan monipuolisia; tietyllä lymfokiinillä on estäviä, stimuloivia, edistäviä, vastustavia ja muita vaikutuksia erilaisten kohdesolujen ja tilojen suhteen. Lisäksi tietty lymfokiini saattaa sekä estää että edistää 35 syövän syntyä erilaisissa olosuhteissa. Esimerkiksi inter-

feronin tiedetään estävän virusten aiheuttamaa syövän syntyä mutta edistävän säteilysyövän syntyä. Samoin on interferonilla toistensa vastaiset vaikutukset, NK-solujen aikaansaaman kasvainsolujen hajoamisen lisääminen ja samalla kasvainsolujen kestävyuden lisääminen NK-solujen vaikutuksia vastaan; ensin mainittu vaikutus ilmenee nopeammin interferonin vaikutukselle alttiiksi joutumisen jälkeen kuin jälkimmäinen.

Lymfotoksiini on vuonna 1968 käyttöön otettu termi, jolla tarkoitetaan antigeenin tai mitogeenin stimuloimien lymfosyyttien, jotka ovat välittäjinä hiiren L-solujen sytolyyttisessä tuhoamisessa, liukenevaa tuotetta (9). Useat laboratoriot ovat myöhemmin osoittaneet, että lymfotoksiinia sisältävillä lymfokiinivalmisteilla on suoria sytolyyttisiä ja sytostaattisia vaikutuksia erilaisiin kasvainsoluihin (7, 30, 31), antikarsinogeeninen vaikutus soluihin, joissa tapahtuu kasvainsoluiksi muuttumista (6, 25, 26), ja kyky lisätä esikasvain- ja kasvainsolujen herkkyyttä NK-välitteiselle tuhoutumiselle (23, 27).

Hamsterin lymfotoksiinivalmisteissa oleva syövänvastainen lymfokiini, joka on erilainen kuin se, joka välittää hiiren L-solujen sytolyyttisen tuhoutumisen, identifioitiin myöhemmin molekyylin varauksen perusteella (24). Tämä molekyyli, jonka molekyylipaino on 50 000 ja isoelektrinen pH 5,0, oli sytostaattinen hamsterin kasvainsoluille, ei estänyt hamsterin sikiön normaaliin fibroblastien kasvua ja esti hamsterin sikiösolujen kemiallisesti ja säteilyllä indusoidun muuttumisen kasvainsoluiksi sekä in vitro että in vivo. Tämä ainutlaatuinen syövänvastainen lymfokiini myös identifioitiin eri aineeksi kuin interferoni, interleukiinit 1 ja 2 ja makrofagiin migraatiota estävä tekijä. Tämä havainto johti lopulta uuteen tutkimussuuntaan, jossa tutkittiin ihmislymfotoksiinivalmisteita sen toteamiseksi, sisältävätkö ihmislymfotoksiinivalmisteet ihmislymfokiinejä, joilla on ainutlaatuiset

antikarsinogeeniset ja kasvainten vastaiset ominaisuudet.

Yhteenveto keksinnöstä

Tämän keksinnön päämääränä oli karakterisoida ja puhdistaa biokemiallisesti ja biologisesti löytämämme ihmislymfokiini, jolla on kasvainten vastaiset ominaisuudet kasvainsolujen suora hajotus, niiden lisääntymisen estäminen ja niiden herkkyyden luontaisten tappajalymfosyyttien välittämälle hajoamiselle lisääminen samoin kuin normaalisolujen karsinogeenisen muuttumisen estäminen. Tämä päämäärä saavutettiin identifioimalla ja eristämällä leukoreguliini, lymfokiini, jonka molekyylipaino on noin 120 000 - 140 000, joka hajoaa alayksiköiksi, joiden molekyylipaino on noin 30 000 - 35 000, ja joka puhdistetaan isoelektrisellä fokusoinnilla pH-alueella noin 4,8 - 5,5 tai noin 7,5 - 8,3.

Toisena tavoitteena oli leukoreguliinin solulähteiden identifioiminen ja menettelytapojen kehittäminen sen tuotannon stimuloimiseksi. Havaitsimme, että perifeerisiä veren leukosyyttejä, jotka ovat leukoreguliinilähde, voitiin stimuloida leukoreguliinin tuotannon edistämiseksi käsittelemällä niitä fytohemagglutiniinilla riittävän kauan vaikutuksen aikaansaamiseksi. Optimaalinen käsitteilyaika oli 48 tuntia; pidemmätkin ja lyhemmätkin ajanjakso saivat aikaan vaikutuksen, vaikkakin pienemmässä määrin. Myös muiden indusoiden, esimerkiksi tetradekanoyli-forboliasetatin, konkanavaliini A:n ja muiden kasvilektiinien, jotka ovat mitogeenisiä, havaittiin edistävän leukoreguliinituotantoa. Lisäksi joissakin tapauksissa valmistettiin tehokkaita leukoreguliinia tuottavia soluja transformoimalla lymfosyyttejä ja muodostamalla hybridomisoluja. Keksinnön mukaiselle menetelmälle on tunnusomaista se, mitä patenttivaatimuksissa esitetään.

Lisätavoitteena oli saada aikaan nopea koe solujen leukoreguliiniherkkyyden tutkimiseksi, mihin tarkoitukseen päästiin valmistamalla hybridomia tai transformoituja leu-

kosyyttejä, jotka tuottavat solupinnan leukoreguliinireseptoreille spesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita, ja mittaamalla kvantitatiivisesti näiden vasta-aineiden sitoutuminen tutkittavaan kohdesoluun.

5 Tämän keksinnön muut tavoitteet ja tunnusmerkit esitetään seuraavassa selostuksessa.

Piirrosten lyhyt kuvaus

Liitteenä olevat kuvat 1 - 11 valaisevat leukoreguliinin muihin lymfokiineihin nähden erilaisia ominaispiirteitä ja vaikutuksia.

Edullisten suoritusmuotojen kuvaus

Olemme havainneet, että ihmislymfokiinivalmisteet sisältävät ainutlaatuista lymfokiinia, jolla on kyky suoralla hajotuksella estää ihmisen kasvainsolujen kasvua, kyky estää solujen proliferaatiota ja kyky lisätä kasvainsolujen herkkyttä luontaisten tappajasolujen (NK-solujen) kautta tapahtuvalle tuhoutumiselle. Olemme alkaneet käyttää tästä lymfokiinistä nimitystä leukoreguliini, koska se on leukosyyttien tuote ja solujen kasvua säätelevä aine, joka on molekulaarisesti ja biologisesti eri aine kuin lymfotoksiini, interferoni, interleukiinit 1 ja 2 ja makrofageja aktivoiva tekijä.

Leukoreguliinin molekyylipaino on noin 120 000 - 140 000 määritettynä polyakryyliamidigeeligradianttielektroforeesilla ja geelisuodatuskromatografialla, ja sen hajoamisessa muodostuvien alayksiköiden molekyylipaino on noin 30 000 - 35 000. Se voidaan puhdistaa tekemällä isoelektrinen fokusointi pH-arvoilla noin 5,0 ja 7,5. Molekyylipainon perusteella ja isoelektrisen fokusoinnin avulla fraktioitu leukoreguliini saadaan vapaana havaittavista määristä lymfotoksiinia, interferonia, interleukiineja 1 ja 2 ja makrofageja aktivoivaa tekijää.

Erityisesti paneuduttiin sen varmistamiseen, että tunnusmerkit, joita me pidämme leukoreguliinille ominaisina, ovat erilaisia kuin lymfotoksiinin vastaavat ominai-

suudet. Todisteiden, jotka osoittavat leukoreguliinin eri aineeksi kuin lymfotoksiini, pääpiirteet ovat seuraavat:

5 (1) lymfotoksiini, joka on saatu ihmisen perifeerisistä veren leukosyyteistä, ja hyvin puhdas lymfotoksiini, joka on saatu RPMI 1788-ihmisen lymfoblastoidisolusta, hajottaa helposti hiiren alfa-L929-kasvainsoluja, mutta sillä ei ole havaittavissa olevaa ihmisen kasvainsolujen vastaista vaikutusta;

10 (2) leukoreguliinin aktiivisuus aleni proteaasi- mutta ei neuramidaasipilkkomisen jälkeen, kun taas lymfotoksiinin aktiivisuus aleni sekä proteaasi- että neuramidaasikäsittelyn jälkeen;

15 (3) leukoreguliini oli erotettavissa lymfotoksiinista isoelektrisen fokusoinnin avulla lajiksi, joka sai aikaan ihmisen kasvainsolujen hajoamisen, niiden kasvun estymisen ja niiden herkistymisen luontaisten tappajasolujen toimesta tapahtuvalle sytolyysille, mutta ei hajottanut hiiren L-soluja (lymfotoksiinin vaikutus). Siten erilaiset leukoreguliini-/lymfotoksiinipitoisuudet PBL-lymfokiinivalmisteissa, neuramidaasi- ja proteaasiherkkyydet
20 sekä erilaiset isoelektriset pisteet osoittivat lopullisesti, että leukoreguliini on eri aine kuin lymfotoksiini.

Leukoreguliini on myös eri aine kuin interferoni, toinen immunologinen hormoni, jolla on kyky estää solujen
25 proliferaatiota. Interferonin on osoitettu estävän joidenkin normaali- ja kasvainsolujen kasvua (2, 18). Alfa- ja gamma-interferoni eivät kuitenkaan vaikuttaneet yhtenkään tässä kuvatussa leukoreguliiniherkän kasvainsolutyyppin proliferaatioon. Vaikka jotkut ihmislymfokiinivalmisteet
30 sisältävät sekä leukoreguliinia että interferonia, voidaan nämä kaksi hormonia erottaa molekyylliseulojen avulla. Interferonin suhteen rikastuneilla fraktioilla ei lisäksi ole leukoreguliiniaktiivisuutta.

35 Kasvainsolujen proliferaation estämisen lisäksi on leukoreguliinin suhteen rikastuneiden fraktioiden osoitet-

tu myös lisäävän kasvainsolujen herkkyyttä NK-välitteiselle sytotoksisuudelle. Tämä vaikutus on päinvastainen kuin interferonilla (33), ja se on yksinomaan leukoreguliinilla. NK-välitteisen sytotoksisuuden eristämisen otaksutaan
5 olevan tärkeä keino, jolla leukoreguliini säätelee kasvainten kasvua in vivo (27).

Tärkeä puoli leukoreguliinin vaikutusmekanismeissa on leukoreguliinin kyky muuttaa kasvainsolujen pintakalvon rakennetta ja läpäisevyyttä. Virtaussytometrillä analyysiä
10 käytettiin näiden muutosten mittaamiseksi muutamien minuuttien kuluessa kohdesolujen saattamisesta alttiiksi leukoreguliinin vaikutukselle. Tämä menetelmä antaa suuret mahdollisuudet tutkimuksille, joissa vaaditaan lyhyitä koeaikoja, kuten leukoreguliinin tai leukoreguliinireseptorin monoklonaalisten vasta-aineiden detektoinnille.
15

Leukoreguliinin ja tuumorinekroositekijän, toisen kasvainsoluja estävän lymfokiinin, välistä sukulaisuutta tutkittiin myös. Ihmistuumorinekroositekijävalmisteet indusoivat joidenkin hiiren sarkoomien hemorragisen nekroosin in vivo, ja niillä on sama vaikutus in vivo kuin lymfotoksiinilla (34). Koska puhdistetulla leukoreguliinilla ei ole samaa biologista vaikutusta kuin lymfotoksiinilla, on leukoreguliini eri aine kuin tuumorinekroositekijä.
20

Hamsterilymfokiinivalmisteet sisältävät lymfotoksiinia, leukoreguliiniaktiivisuutta (hamsterin kasvainsolujen, muttei normaalisolujen, kasvun estäminen) ja antikarsinogeenista aktiivisuutta. Leukoreguliiniaktiivisuus ja antikarsinogeeninen aktiivisuus puhdistuvat yhdessä; näillä kahdella aktiivisuudella on kuitenkin kaksi erilaista isoelektristä pH-arvoa, joista toinen on eri kuin hamsterin lymfotoksiinilla ja toinen identtinen hamsterin lymfotoksiinin kanssa (24). Neuramidaasi hajottaa hamsterin lymfotoksiinia, kun taas leukoreguliini- ja antikarsinogeeniseen aktiivisuuteen sillä ei ole vaikutusta. Hamsterin leukoreguliini- ja antikarsinogeeninen aktiivisuus
25
30
35

ovat kuitenkin samalla tavalla alttiita proteaasipilkkoutumiselle. Tästä seikasta yhdistettynä muihin biokemiallisiin tietoihin päättelemme, että myös hamsterin leukoreguliinilla on aktiivisuus. Koska ihmisen leukoreguliinilla on osoitettu olevan samat biologiset ja biokemialliset ominaispiirteet kuin hamsterin leukoreguliinilla, pitäisi myös sen olla antikarsinogeeninen.

Kun saadaan viranomaisten lupa klinisiin kokeisiin, joissa kokeillaan leukoreguliinin käyttöä ihmisen syövän hoidossa, tehdään ensimmäisen vaiheen klinisiä kokeita potilailla, joilla on pitkälle edenneitä kasvainsairauksia. Potilaille annetaan leukoreguliinia seuraavassa kuvattavalla tavalla. Annoksia suurennetaan, jotta saataisiin määritetyksi suurin siedettävissä oleva annos kussakin terapiamuodossa tarkkailemalla toksisia reaktioita, joista ovat osoituksena ruansulatuskanavan häiriöt, anemia, leukopenia, kuume tai muu osoitus elinten vaurioitumisesta tai toimintahäiriöstä. Otaksutaan leukoreguliinin olevan erittäin hyvin siedettyä, mikä tekee mahdolliseksi korkeiden annosten antamisen. Hoitokokeilut, joissa käytettiin osittain puhdistettuja PHA-stimuloitujen periferisen veren lymfosyyttien supernatantteja, jotka epäilemättä sisälsivät leukoreguliinia, ovat viitanneet tällaisten materiaalien hyvin pieneen toksisuuteen (13).

Toisen vaiheen kliniset kokeet kohdistuvat leukoreguliinin tutkimiseen potilailla, joilla on rajoittunut sairaus ja joilla terapian edut ovat ilmeisimpiä. Alkukokeissa käytetään leukoreguliinia apuaineena päähoitona olevalle kirurgiselle, kemo- tai radioterapialle, myöhemmissä kokeissa voidaan tutkia leukoreguliinia päähoitomuotona.

Leukoreguliinia annetaan systeemisesti laskimon- tai imukudoksensisäisesti, paikallisesti kasvaimensisäisinä ruiskeina tai vatsakalvohuuhteluna, tai ex vivo-hoitona. Esimerkkinä viimeksi mainitusta on hoito, jossa poti-

laasta poistetaan luuydinsoluja, käsitellään ne leukoreguliinilla kasvainsolujen poistamiseksi ja käytetään niitä täydentämään potilaiden luuydintä, sen jälkeen kun heidän luuytimeensä on annettu hyvin suuria annoksia kemo- tai radioterapiaa.

Leukoreguliinia annetaan jatkuvana infuusiona tai yksittäisinä ruiskeina sen mukaan, mitä vaaditaan tarpeellisten leukoreguliinitasojen ylläpitämiseksi verenkierrössä ja kudoksissa.

Vaihtoehtona suoralle antamiselle, olisi leukoreguliinia koodaavien geenien kloonaminen ihmisen imusoluihin, joista on tehty lisääntymiskyvyttömiä, eräs lähestymistapa pysyvän in vivo-leukoreguliinipitoisuuden ylläpitämiseksi in vivo tapahtuvan tuotannon kautta. Solujen, joilla on rajoitettu elinikä in vivo, käyttö takaisi sen, että leukoreguliinitasot olisivat säädeltävissä suhteellisen lyhyissä ajanjaksoissa.

Muihin vaihtoehtoisin annon ohjaamiseksi kuuluvat leukoreguliinia koodaavien geenien sijoittaminen viruksen genomiin ja viruksen käyttäminen geenien viemiseen spesifiseen soluryhmään, jota tekevät geenien translaation leukoreguliiniksi, jolloin vältetään normaalit säätävät tuotteet, jotka muuten rajoittaisivat leukoreguliinituotantoa. Esimerkiksi Epstein-Barr-virus, joka infektoi vain B-lymfosyyttejä ja saa tavallisesti aikaan rajoitetun, melko lievän infektion, voisi toimia sopivana virusvektorina leukoreguliinigeeneille, jos viruksen genomia muutetaan siten, että estetään virusinfektion aiheuttama taudin eteneminen.

Kiinteitä kasvaimia hoidetaan tehokkaimmin maksimoimalla leukoreguliinipitoisuus kasvaimen välittömässä läheisyydessä sen sijaan, että yritettäisiin pitää yllä hyvin korkea taso koko elimistössä. Ihmisen monoklonaaliset vasta-aineet, jotka ovat kvalitatiivisesti tai kvantitatiivisesti spesifisiä kasvainsolujen pinta-antigeeneil-

le, tarjoavat sopivan "koukun", johon leukoreguliini voidaan liittää kasvaimensisäisten suurten pitoisuuksien takaamiseksi. Toinen lähestymistapa on sulkea leukoreguliini liposomien sisään, joiden pinnoilla voi olla kasvainspesifisiä monoklonaalisia vasta-aineita. Liposomitriglyseridien asianmukaisella valinnalla saadaan liposomeja, jotka ovat resistenttejä verenkierrrossa olevalle amylaasientsyymille ja joilla on kyky fuusioitua kasvainsolukalvoihin liposomien leukoreguliinisisällön kuljettamiseksi solun sisään. Lipofiilisiä kantaja-aineita (dimetyylisulfoksidia, boorihappojohdoksia) voidaan sisällyttää liposomiin sen sisällön kuljetuksen parantamiseksi liposomin membraanilipidin ja kohteena olevan kasvainsolun vastaavien aineiden parantuneen fuusioitumisen kautta.

Leukoreguliini näyttää suurentavan kemoterapeuttisten aineiden kasvaintenvastaisia vaikutuksia (19) lisäämättä niiden toksisia sivuvaikutuksia, jolloin saadaan aikaan paljon korkeampi tehokas annostaso. Leukoreguliinia käytetään siksi hoito-ohjelmissa erilaisten kemoterapeuttisten aineiden ja radioterapian kanssa tämän kasvaintenvastaisuutta edistävän vaikutuksen arvioimiseksi.

Leukoreguliinin antikarsinogeeniset vaikutukset ovat yhtä tärkeitä kuin sen kasvaintenvastainen vaikutus, kun sitä käytetään yhdessä sytotoksisten terapeuttisten aineiden tai radioterapiamenettelyjen kanssa. Eriytyisen salakavala tapahtumasarja, joka liittyy säteilytykseen ja kemoterapiaan, on uusien, hoidettavaan sairauteen liittymättömien kasvainten ilmaantuminen. Annettaessa samanaikaisesti leukoreguliinia, voidaan käyttää paljon suurempia annoksia kemoterapiassa tai radiohoidossa, koska leukoreguliini estää näiden aineiden tai tekijöiden karsinogeeniset vaikutukset. Leukoreguliini on samalla tavalla hyödyllinen käytettynä yhdessä immuunisuppressiivisten lääkkeiden kanssa hoidettaessa autoimmuunisairauspotilaita ja siirrännäisten vastaanottajia.

Leukoreguliini on päätekomponentti sytokiini-lymfokiiniketjussa, joka sisältää lymfosyyttien ja monosyyttien käyttöönoton ja immobilisoinnin, niiden aktivoitumisen tai erilaistumisen ilmentämään erilaisia efektorifunktioita ja tekijöiden, kuten leukoreguliinin, jotka toimivat sytotoksisesti, tuotannon. Erilaisten lymfokiinien käytettynä seoksena tai, todennäköisemmin, annettuna sopivassa järjestyksessä pitäisi edistää kasvaimen lymfoidisoluinfiltraatiota (makrofagien migraatiota estävä tekijä, interleukiini 1), stimuloida niiden sytotoksista toimintaa (makrofageja aktivoiva tekijä, interleukiinit 1 ja 2, leukoreguliini ja interferoni), hyökätä suoraan kasvainsoluja vastaan (leukoreguliini, NK-sytotoksinen tekijä ja interferoni) ja muuttaa kohteena olevat kasvainsolut herkemiksi sytotoksiksille efektorisoluille (leukoreguliini). Tässä hoitomuodossa leukoreguliinilla on hyvin tärkeä osa.

Kasvainsolujen kasvua hillitsevien ja NK-soluvälitteistä sytotoksisuutta edistävien vaikutusten lisäksi, jotka yhdessä pysäyttävät kasvainten kasvun ja alkavat pienentää kasvainmassoja, on leukoreguliinilla myös anti-karsinogeenisia ominaisuuksia, jotka ovat erityisen hyödyllisiä käytettäväksi yhdessä materiaalien kanssa, joita käytetään biolääketieteellisissä diagnostisissa tutkimuksissa ja säteily- tai kemoterapiassa, jotka itse voivat indusoida syövän synnyn (26). Leukoreguliinihoito proseduurien, joilla on on näitä mahdollisia sivuvaikutuksia, aikana estää karsinogeneesin kokeiden tai hoidon aikana (20).

Samalla tavalla voidaan potilaista arvioida immunisuppressiotaso ja mahdollinen pahanlaatuisten kasvaimien muodostusriski mittaamalla potilaiden PBL-leukoreguliini-tuotanto stimuloinnin jälkeen.

Liitteenä leukoreguliinihoidolle potilaan syöpäsolujen leukoreguliiniherkkyyden määrittäminen antaisi

ennusteen leukoreguliinihoidon tehosta. Potilaan kasvainsolujen viljeleminen leukoreguliinia sisältävän, puolikiinteän alustan läsnäollessa on keino määrittää se leukoreguliinimäärä, joka tarvitaan kasvainsolujen kasvun täydelliseen estämiseen. Nopeampi koe on sellainen, jossa määritetään kasvainsolujen reagoivuus mittaamalla kvantitatiivisesti kasvainsolun pinnalla olevien solupinnan leukoreguliinireseptorien määrä. Tämä tehdään mittaamalla kasvainsoluihin sitoutuvan leukoreguliinireseptoriin suuntautuvan monoklonaalisen vasta-aineen määrä käyttämällä entsyymiin liitetty immuunisorbentti-koetta, radioimmuunikoetta tai immuunifluoresenssikoetta.

Esimerkki 1

Seuraavassa selostuksessa käytettävät lyhenteet ovat: PBS, 0,14 mol/l NaCl:a, 0,1 mol/l natriumfosfaattia, pH 7,4; PEG, polyetyleeniglykoli, molekyylipaino 4000; FBS naudan sikiöseerumi; IEF, isoelektrinen fokusointi; HPLC, korkean erotuskyvyn nestekromatografia; NK, luontainen tappajalymfosyytti; dThd, tymidiini; MTT, 3-(4,5-dimetyylitiatsolyyli-2)-2,5-difenyyli-tetratsoliumbromidi; FDA, fluoreseiinidiasetaatti; VCN, Vibrio cholera-neuramidaasi; PHA, fytohemagglutiniini; PBL, perifeerinen veren leukosyytti; TPA, tetradekanoyyliforboliasettaatti; ELISA, entsyymiin kytketty immuunisorbentti-koe; RIA, radioimmuunikoetta.

Lymfokiinin valmistus

10 - 20 ml sentrifugoidun, normaalin ihmisluovuttajan veren vaalean pintakerroksen leukosyyttejä laitettiin lymfosyyttien erotusväliaineeseen (10 ml, LSM, Litton Bionetics, Kensington, Maryland) ja sentrifugoitiin kiihtyvyydellä 700 x g 20 min huoneen lämpötilassa. Yksitumaiset solut kerättiin LSM:n ja plasman rajapinnalta, pestiin kahdesti RPMI 1640-alustalla ja laskettiin mikroskooppisesti trypaanisinisien (0,04 %) läsnäollessa elävien solujen osuuden määrittämiseksi, joka oli aina yli 95 %.

20 miljoonaa solua siirrostettiin 20 ml:aan RPMI 1640:a, joka sisälsi 10 µg PHA:ta/ml (PHA, tyyppin IV leukoagglutiini, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), 100 mm:n muovisessa kudosviljelymaljassa ja inkuboitiin 37 °C:ssa 5 kostutetussa inkubaattorissa, joka sisälsi 5 % CO₂:a ja 96 % ilmaa.

24, 48 tai 72 tunnin kuluttua erittyneitä lymfokiinejä sisältävälymfosyyttiviljelyalusta kerättiin, ja sitä sentrifugoitiin 10 min kiihtyvyydellä 1000 x g solujen poistamiseksi. Lymfokiinialusta konsentroidtiin 40-
10 kertaisesti YM10-kalvolla Amicon-kennossa (Amicon, Inc., Danvers, MA) ja dialyysisuodatettiin 0,1 % PEG:tä sisältävää PBS:ää vastaan. Konsentroidu lymfokiini steriloidtiin suodattamalla, jaettiin yhtä suuriksi annoksiksi, pakastettiin -30 °C:ssa ja käytettiin 1 kk:n kuluessa pakastamisesta (katso taulukko 1).
15

Lymfoblastoidisolulinjan RPMI 1788 tuottamaa hyvin puhdasta ihmislymfotoksiinia (1) luovutti jalomielisesti tri Bharat B. Aggarwal (Genentech, Inc., San Francisco, CA). 1788-solulinjan lymfotoksiini puhdistettiin tekemällä peräkkäin DEAE-selluloosakromatografia, preparatiivinen isoelektrinen fokusointi, virvilälektiini-Sepharose-kromatografia ja preparatiivinen polyakryyliamidigeelielektroforeesi (1). Puhdistetun lymfotoksiinin molekyylipaino oli 20 000, isoelektrinen piste 5,8 ja ominaisaktiivisuus 4 x
25 10⁷ yksikköä/mg proteiinia.

Syyriankultahamsterin lymfokiinia tuotettiin vatsakalvon leukosyyteistä samalla tavalla kuin edellä kuvattua ihmisen lymfokiiniä (24).

30 Kohdesolut

Ihmisen erytroleukemiasoluja K562 luovutti tri Julien Djeu (Bureau of Biologics, Food and Drug Administration, Bethesda, MD). OST-solut, joita pidettiin yllä viljelmässä laboratoriossamme, olivat peräisin juuri poistetusta ihmisen osteosarkoomasta, jonka ystävällisesti
35

lahjoitti tri Elizabeth Grimm (NTH Clinical Center, Bethesda, MD). Ihmisen ihon normaalit fibroblastit, CRL 1457 (20-vuotias nainen), CRL 1505 (21-vuotias mies), CRL 1537 (14-vuotias mies), normaalit paksusuolen limakalvon solut ja kaikki muut ihmisen kasvainsolulinjat saatiin the American Type Culture Collectionista (Rockville, MD).

Kaikkia soluja pidettiin yllä MEM-alustassa (Eagles minimal essential medium), jota oli täydennetty 10 %:lla FBS:ä, ja jatkoviljeltiin kerran viikossa samaan alustaan, poikkeuksena K562-solut, jotka pidettiin yllä 10 % FBS:ä sisältävässä RPMI 1640:ssä. Hiiren alfa-L929-solut lahjoitti tri Gale Granger (USC, Irvine, CA), ja niitä käytetään lymfotoksiinin kohteena (7). 7997-solut ovat syyriankultahamsterin bentso(a)pyreeni-indusoitu kasvainsolulinja (8).

Lymfotoksiinimääritys

Lymfotoksiiniaktiivisuus mitattiin hiiren alfa-L929-solujen hajoamisena käyttämällä radionuklidin vapautuskoetta (7). Valmisteessa olevien sytolyyttisten lymfotoksiinisyksiköiden lukumäärä määritettiin piirtämällä regressiosuora näytteen laimennussuhteen, joka aiheutti [³H]-dThd-merkkiaineen 50 %:sen vapautumisen 1×10^4 L929-solussa 3 vrk:n inkuboinnin aikana, käänteisluvun logaritmisista (katso taulukko 2).

Leukoreguliinimääritys

Ihmisen leukoreguliinin aktiivisuus mitattiin ihmisen kasvainsolujen kasvun estona (sytostaattinen vaikutus). Sytostaattisen vaikutuksen mittaamista varten siirrostettiin 10^4 kasvainsolua 0,5 ml:ssa sopivaa kasvualustaa 24-syvennyksisiin viljelymaljoihin (Costar, Inc., Cambridge, MA). Joko alustaa tai 100-kertaiseen laimennukseen asti laimennettuja tutkittavia näytteitä 0,5 ml:ssa alustaa lisättiin kolmena rinnakkaisnäytteenä, ja soluja inkuboitiin 37 °C:ssa kostutetussa kammiossa, joka sisälsi 5 % CO₂:a ja 95 % ilmaa, 3 vrk. Kiinnittymättömät solut määri-

tettiin kvantitatiivisesti suspendoimalla ne 9 ml:aan Hematalia ja tekemällä laskenta Coulter Counter, malli ZBI-laitteella (Coulter Instrumets, Inc., Hialeah, FL). Tarttuvat solut irrotettiin inkuboimalla 1 min 37 °C:ssa

5 0,02 % trypsiiniä sisältävässä PBS:ssä ennen laskentaa, joka tehtiin kuten edellä (katso taulukko 2).

Joissakin kokeissa solujen kasvun esto määritettiin mikrokoetta käyttämällä. Tässä kokeessa siirrostettiin 2 x 10³ solua 100 µl:ssa 10 % FBS:ää sisältävässä RPMI 10 1640:ssa 96-syvennyksisiin mikromaljoihin. Sitten lisättiin 100 µl alustaa, 0,5 %:sta SDS:ää tai lymfokiininäytettä neljänä rinnakkaisnäytteenä, ja maljoja inkuboitiin 37 °C:ssa kostutetussa kammiossa, joka sisälsi 95 % ilmaa ja 5 % CO₂, 3 vrk. Tarttuville soluille käytettiin tasapohjaisia maljoja ja tarttumattomille K562-soluille pyöreäpohjaisia maljoja. Kuhunkin syvennykseen lisättiin 20 µl 15 MTT:tä (Sigma) (5 mg/ml PBS:ää - liuotettiin voimakkaasti sekoittamalla ja valmistettiin juuri ennen käyttöä). Levyjä inkuboitiin vielä 4 tuntia 37 °C:ssa ja alustat poistettiin 20 imemällä varovasti neulalla nro 18 g. Pelkistynyt MTT, tummanpunainen formatsaanisakka, saatettiin liuokseen lisäämällä 100 µl isopropanolia, joka sisälsi 0,05 mol/l HCl:a. Värin absorbanssi mitattiin aallonpituudella 540 nm automaattisella pystysädemittarilla ARTEK (ARTEK Systems, 25 Inc., Farmingdale, New York). SDS:ää sisältävää näytesyvennystä käytettiin nollakokeena, ja sen antama arvo vähennettiin kaikkien näytteiden lukemista. Esikokeissa soluja siirrostettiin vaihtelevina tiheyksinä, ja muodostuneen pelkistyneen sakan määrän havaittiin olevan suoraan 30 verrannollinen solujen lukumäärään syvennystä kohden. Mikrotutkimuksen herkkyys oli vertailukelpoinen solulaskentakokeen herkkyiden kanssa.

Solujen kasvun prosentuaalinen esto kussakin kokeessa laskettiin jakamalla tutkittavan näytteen solujen tai absorbanssiyksiköiden määrän keskiarvo alustavertailu- 35

syvennysten solujen tai absorbanssiyksiöiden määrän keskiarvolla, vähentämällä 1 ja kertomalla 100 %:lla. Sytostaattiset leukoreguliiniyksiköt määritettiin piirtämällä regressiosuora, joka kuvaa näytteen laimennussuhteen käänteisluvun logaritmia prosentuaalisen kasvun eston funktiona, ja se oli yhtä suuri kuin solukasvun 50 %:isen eston aikaansaavan laimennussuhteen käänteisarvo. Ihmisen pakusuolikarsinoomasolulinja HT-29 on hyvin herkkä leukoreguliinin kasvua estävälle vaikutukselle, ja sitä käytettiin leukoreguliinin mittauksessa standardina, johon muita soluja verrattiin.

Sytolyyttisen aktiivisuuden määrittämistä varten solu leimattiin ennalta [³H]-dThd:llä (7) ja siirrostettiin 10⁴ solua 0,5 ml:ssa/syvennys 24-syvennyksisiin maljoihin. 0,5 ml alustaa, 0,5 %:sta natriumdodekyylisulfaattia (SDS) tai tutkittavaa näytettä laimennettuna 100-kertaiseen laimennukseen asti lisättiin kolmena rinnakkaisnäytteenä, ja soluja inkuboitiin 3 vrk.

Maljoja sentrifugoitiin kiihtyvyydellä 200 x g 10 min, ja poistettiin 200 µl:n annokset supernatanteja, suspendoitiin 2,8 ml:aan Ultrafluoria (NEW, Boston, MA) ja tehtiin laskenta LKB Scintillation Counter-laitteella (LKB Instruments, Inc., Rockville, MD). Prosentuaalinen [³H]-dThd-ominaisvapautus laskettiin seuraavasti:

$$[\text{}^3\text{H}]\text{-ominaisvapautus (\%)} = \frac{\text{pulssimäärän ka., näyte (min}^{-1}\text{)} - \text{pulssimäärän ka., alusta (min}^{-1}\text{)}}{\text{pulssimäärän ka., SDS (min}^{-1}\text{)} - \text{pulssimäärän ka., alusta (min}^{-1}\text{)}}$$

Sytolyyttisten leukoreguliiniyksiköiden luku laskettiin samalla tavalla kuin sytolyyttiset lymfotoksiiniyksiköt.

Karsinogeneesimäärittäminen

Syyriankultahamsterin lymfokiinivalmisteiden aikaansaama syyriankultahamsterin sikiösolujen kemiallisesti ja säteilyllä indusoidun muuttumisen estoa tutkittiin käyttämällä aiemmin kuvattua (24, 25) in vivo - in vitro - istukan kautta tapahtuvaa transformaatio-koetta (katso taulukko 3).

Interferonimäärittäminen

Interferonia tutkittiin Biofluids, Inc.:n (Rockville, MD) menetelmällä määrittämällä puolimikrosytopaattisen vaikutuksen, jonka vastasyntyneen ihmisen esinahan fibroblastien tai WISH-solujen infektointi naudan rakkulaisella suutulehduksella aiheuttaa, esto. Ihmisen WISH-solulinja on 5 - 10 kertaa niin herkkä gammainterferonille kuin ihmisen esinahasolut. Havaitsemisraja tässä kokeessa on 1 yksikkö viruksenvastaista aktiivisuutta, joka standardoidaan referenssiaineena NIH-ihmisen fibroblasti-interferoni (katso taulukko 4).

Joissakin kokeissa määritettiin alfa- ja gammainterferonin vaikutukset biologisilla solukokeilla. Alfa-interferoni (ostettu Sigmaalta) tuotettiin Burkitt-lymfoomasoluissa (Namalva) indusoimalla Sendai-viruksella, ja sen ominaisaktiivisuus oli $1,1 \times 10^6$ kansainvälistä referenssiyksikköä/mg proteiinia. Gammainterferonin, jonka ominaisaktiivisuus oli 10^5 viruksenvastaista yksikköä/ml toimitti ystävällisesti tri Gary Thurman (NCI, Frederick Cancer Research Facility, Frederick MD), ja sen olivat valmistaneet Flow Laboratories, Inc. (McLean, VA) ja Meloy Laboratories (Springfield, VA) the Biological Response Modifiers Programia varten (NCI Frederick Cancer Research Facility, Frederick, MD) (katso taulukko 5).

Interleukiinit 1 ja 2

Interleukiini 1 -aktiivisuus määritettiin mittaamalla PHA:han reagoivien C3H/HeJ-hiiren tymosyyttien proliferointi edistymisen lymfokiinin vaikutuksesta. Tymo-

syyttien proliferaatio voi heijastaa interleukiini 2:n läsnäoloa; sen vuoksi lymfokiini tutkittiin myös interleukiini 2:n suhteen käyttämällä tavanomaista mikrokoetta (3, 22), joka perustuu ihmisen interleukiini 2:lle herkän OH-1-marmosetin jatkuvan T-solulinjan interleukiini 2:sta riippuvaiseen proliferaatioon. Ihmisinterleukiini 2-standardilla (toimittaja tri P. Jagannath, Litton Bionetics, Inc. Kensington, MD) oli puolet korkeimmasta proliferaation edistämiskyvystä laimennuksena 1:1500. Ihmisinterleukiinistandardi valmistettiin laboratoriossamme käyttämällä tässä kuvattua lymfokiinituotantomenetelmää (katso taulukko 4).

Makrofaagien aktivointi- ja endotoksiinikokeet

Nämä kaksi koetta teki ystävällisesti tri Gary Thurman, NCI, Frederick Cander Research Facility, Frederick, MD. Makrofageja aktivoiva vaikutus mitattiin lymfokiinin kykyä edistää ihmisen monosyyttien sytotoksista vaikutusta ihmisen kasvainsoluihin (14). Endotoksiini määritettiin kromogeenikokeella (Endotoxin chromogenic assay kit, M.A. Bioproducts, Walkerville, MD), jonka herkkyysalue ulottuu noin 0,1 ng:aan. Endotoksiinin mahdollista osallistumista kasvainsolujen kasvun estoon tutkittiin myös. Endotoksiinia (lipopolysakkaridi), jonka serotyypinumerot ovat 055:B5 ja 011:B4 (Sigma) käytettiin kasvainsolusytostaattisuustestiin pitoisuuksina 0,01, 0,1, 1,0, 10,0 ja 20 ng/ml. Vaikutus kasvainsolujen kasvuun mitattiin edellä kuvatulla tavalla (katso taulukko 4).

Isoelektrinen fokusointi

Konsentroitujen lymfokiinien isoelektrinen fokusointi preparatiivisessa pylväässä tehtiin amfoliinigradientissa (LKB. Rockville, MD) pH 3,5-10 110 ml:n isoelektriseen fokusointiin tarkoitettussa pylväässä (LKB) (28). Kerättiin kolmen millilitran fraktioita, ja mitattiin kunkin fraktion pH. Valitut fraktiot yhdistettiin, dialyysisuodatettiin 0,1 % PEG:tä sisältävää PBS:ää vas-

taan, steriloidtiin suodattamalla 0,22 μm :n Millex-suodattimella (Millipore Corp., Bedford, MA), ja tutkittiin biologinen aktiivisuus. (Katso taulukko 4 ja kuva 8).

HPLC

5 Molekyylikokoon perustuvat erotukset tehtiin käyttämällä preparatiivista Toyasoda G3000 SWG-geeli-HPLC-kolonnia (markkinoija LKB). Eluointi isokraattisesti kahden millilitran näytteitä virtausnopeudella 4 ml/min 0,02 M natriumfosfaattipuskurilla, pH 7,4, joka sisälsi 10 0,1 % PEG:tä. Kerättiin neljän ml:n fraktioita, steriloidtiin ne suodattamalla, ja tutkittiin niiden biologinen aktiivisuus (katso kuva 4).

Molekyylin varaukseen perustuva HPLC-erotus tehtiin analyttisessä anioninvaihtokolonnissa Toyasoda DEAE-545. 15 Näytteet, jotka olivat 20 mM Tris-HCl:ssä, pH 7,4, joka sisälsi 0,1 % PEG:tä, eluointi käyttämällä lineaarista yhden tunnin gradienttia 0,5 M NaCl virtausnopeudella 0,75 ml/min. Kerättiin kahden minuutin aikana valuneita fraktioita, steriloidtiin ne suodattamalla ja tutkittiin ne (katso kuva 9).

Polyakryyliamidigeelielektroforeesi

Konsentroidut leukoreguliininäytteet (joko fraktioimattomat tai HPLC-geelisuodatuksella ja ioninvaihtokromatografialla erotetut) käsiteltiin elektroforeettisesti 25 polyakryyliamidigeeleillä, joissa vallitsi lineaarinen gradientti 4-30 %. Elektroforeesin jälkeen geelit viipaloitiin 0,25 mm:n osiksi, ja viipaleita eluointi yön yli 10 % FBS:ää sisältävässä väliaineessa. Eluaatit suodatettiin steriileiksi ja tutkittiin. (Katso kuva 5).

30 ^{125}I :llä leimattu puhdistettu leukoreguliini käsiteltiin elektroforeettisesti myös 15 %:isilla polyakryyliamidigeeleillä, jotka oli varustettu 5 %:isella latoamisakryyliamidigeelillä, joka sisälsi 1 % natriumdodekyyli-sulfaattia (15). Näyte visualisoitiin autoradiografisesti 35 (katso kuva 7).

Puhdistetun leukoreguliinin radionuklidileimaus

25 yksikköä leukoreguliinia, joka oli puhdistettu peräkkäisillä HPLC:llä ja polyakryyliamidigeelielektroforeesilla, leimattiin ^{125}I :llä käyttämällä kloramiini Tmenetelmää (17) ja lisäämällä naudan seerumialbumiinia kantajaproteiiniksi leimatun leukoreguliinin erottamiseksi reagoimattomasta ^{125}I :sta Sephadex G-10-kolonnilla.

Geelisuodatuskolonnikromatografia

^{125}I -leimattu puhdistettu leukoreguliini eluoitiin S-300-kolonnilla (Pharmacia Fine Chemicals, Upsala, Ruotsi) 10 mM NaPO_4 -puskurilla, joka sisälsi 1,0 mol/l NaCl :a, pH 7,4. Kerättiin kahden ml:n fraktioita, ja tehtiin niille laskenta (katso kuva 6).

Entsymaattinen pilkkominen

Ihmisen ja hamsterin leukoreguliini- ja lymfotoksiiniaktiivisuuksien alttius neuramidaasi- ja proteaasi-pilkkoutumiselle tutkittiin (29). Puoli ml konsentroitua ihmisen tai hamsterin lymfokiinivalmistetta lisättiin 50 μl :aan VCN:ää (500 yksikköä/ml, Calbiochem-Behring Corp., LaJolla, CA) ja 0,5 ml:aan 0,1 M natriumasetatipuskuria, pH 5,1. Vertailunäytteiksi lisättiin 0,1 ml lymfokiiniä 0,5 ml:aan asetatipuskuria, 0,5 ml:aan asetatipuskuria, joka sisälsi 50 μl VCN:ää ja 50 μl 0,2 M sialinihappoa (Sigma) (tämä sialinihappopitoisuus inaktivoi entsyymin) tai 0,5 ml:aan väliainetta. Näytteitä inkuboitiin 60 min 37 °C:ssa, dialysoitiin PBS-PEG-liuosta vastaan YM10-kalvolla varustetussa Amicon-kennossa, ja säädettiin näytteiden tilavuudet 3 ml:ksi. Proteolyyttisten pilkkomisten tekemiseksi lisättiin 1 ml lymfokiininäytettä 1 ml:aan trypsiinipitoista PBS:ää (32 yksikköä/ml, ominaisaktiivisuus 195 yksikköä/mg, Worthington Enzymes Inc., Freehold, NJ), 1 ml:aan kymotrypsiinipitoista PBS:ää (6 yksikköä/ml, ominaisaktiivisuus 59 yksikköä/mg, Sigma) tai 1 ml:aan liuosta, joka sisälsi pronaasia (6 yksikköä/ml, ominaisaktiivisuus 6 yksikköä/mg, Sigma) 0,1 M Tris-emäs-

liuoksessa, joka sisälsi 3 mM CaCl₂:a ja 3 % tolueenia. Pronaasi aktivoitiin inkuboimalla liuosta, joka sisälsi 10 mg pronaasia/ml 0,1 M trispuskurissa, joka sisälsi 15 mmol/l CaCl₂:a, pH 7,8, 30 min 37 °C:ssa juuri ennen lisäämistä näytteeseen. Proteaasipitoisia näytteitä tai proteaasipuskurivertailunäytteitä inkuboitiin 60 min 37 °C:ssa. Kuhunkin näytteeseen lisättiin 1 ml FBS:ää, ja näytteet laimennettiin satakertaiseen laimennokseen asti ulottuvalle alueelle väliaineella koetta varten (katso taulukko 3).

M-sytotoksisuusko

Kohdesolujen herkkyuden lisääntyminen leukoreguliinikäsittelyn jälkeen NK-välitteiselle sytotoksisuudelle määritettiin suurin piirtein aiemmin kuvatulla tavalla (23). LSM-gradienttisentrifugoinnilla eristetyt normaalit ihmisen perifeeriset veren yksitumasolut johdettiin nylonvillan läpi makrofagien ja B-solujen poistamiseksi ja NK-solujen rikastamiseksi samalla. K562-kohdesoluja leimattiin 18 tuntia lisäämällä 1000 µCi ⁵¹Cr:a natriumkromaattina (NEN, Boston, MA). Kohdesolut pestiin kolmesti 10 % FBS:ää sisältävällä 1640:llä ja suspensoitiin pitoisuudeksi 2,5 x 10⁵ solua/ml alustaa tai alustalla laimennettua lymfokiininäytettä. Kohdesoluja inkuboitiin sitten 30 min 37 °C:ssa, sentrifugoitiin kiihtyvyydellä 280 x g 5 min ja suspendoitiin uudelleen 10 % FBS:ää sisältävään 1640:een pitoisuudeksi 105 solua/ml. 100 µl soluja lisättiin putkiin, jotka sisälsivät 100 µl alustaa tai efektorisoluja efektorisolu:kohdesolu-suhteen ollessa 25:1, 10:1 tai 2,5:1. Sitten tehtiin 4 tuntia kestävä ⁵¹Cr-vapautumiskoe (23). Spontaani ⁵¹Cr-vapautuminen oli 15 - 20 %, kun soluja esi-inkuboitiin joko alustassa tai lymfokiinissä. Lymfokiinin aikaan saaman tehostumisen aste määritettiin vertaamalla alustassa inkuboitujen kohdesolujen NK-sytotoksisuushajotusyksiköiden määrää lymfokiinissä inkuboitujen kohdesolujen vastaavaan arvoon. Hajotusyksikkö, joka mää-

ritellään siksi lymfosyyttien lukumääräksi, joka saa aikaan kohdesoluista ominaisvapautumisen 15 % ⁵¹Cr:sta, laskettiin käyttämällä Van Kroughin yhtälöä (21, 32), (katso taulukko 6 ja kuva 3).

5 Virtaussytometrinen analyysi

K562-solut suspendoitiin takaisin 10 % FBS:ää sisältävään RPMI 1640:een pitoisuudeksi 4×10^6 /ml. Muoviputkiin (koko 12 x 75 mm) laitettiin 250 µl solususpensiota ja lisättiin 250 µl lymfokiininäytettä. Putkia inkuboitiin 10 37 °C:ssa atmosfäärissä, jossa oli 5 % CO₂:a ja 95 % kostutettua ilmaa, lavakeinuttimella (Bellco Co., Vineland, NJ), jonka pyörimisnopeus oli 6 kierrosta minuutissa, 30 min - 6 tuntia.

Instrumentointi

15 Virtaussytometriset analyysit tehtiin käyttämällä fluoresenssiaktivoitua solulajittelijaa FACS IV, joka oli varustettu 5 W:n argonionilaserilla, joka toimii eksitaatiolähteenä, 256-kanavaisella pulssinkorkeusanalysointirilla ja logaritmisilla vahvistimilla. Soluista analysoitiin 20 pienessä kulmassa tapahtuva valon siroaminen eteenpäin ja fluoresenssi, kun ne oli johdettu suuttimen läpi, jonka läpimitta oli 70 µm, suojanesteeseen, jona toimi MILLI-Q-suodatettu (Millipore Corp., Bedford, MA) vesi. Pienessä kulmassa tapahtuva valon siroaminen eteenpäin- 25 signaaleja, solujen koon ja muodon indikaattoria, käytettiin liipaisusignaalina kaikissa analyysissä. Kaikki optiset suodatimet toimitti Becton-Dickinson laitteen mukana, ellei toisin mainita.

FDA-fluorokromasia

30 FDA:ta käytettiin solukalvon läpäisevyyden mittaamiseen (5). FDA:sta (Polyscience, Inc., Warrington, PA) valmistettiin varastoliuos liuottamalla kiteistä FDA:ta asetoniin pitoisuudeksi 5 mg FDA:ta/l. Käyttöliuos valmistettiin juuri ennen käyttöä laimentamalla varastoliuos 35 10 % FBS:ää sisältävällä RPMI 1640:llä lopulliseen FDA-

pitoisuuteen 6,25 µg/ml. K562-solut pestiin lymfokiinikäsittelyn jälkeen kerran 10 % FBS:ää sisältävällä RPMI 1640:llä ja suspendoitiin 1 ml:aan käyttöliuosta, jonka FDA-pitoisuus oli 6,25 µg/ml, inkuboitiin huoneen lämpötilassa 5 min ja analysoitiin sitten virtausytometrillä.

Propidiumjodidifluorokromasia

Myös propidiumjodidia käytettiin solukalvon läpäisevyyden mittaamiseen. Propidiumjodidista (Calbiochem-Behring Corp., La Jolla, CA) valmistettiin varastoliuos liuottamalla propidiumjodidia PBS:ään, pH 7,4 pitoisuudeksi 500 µg/ml. Käyttöliuos valmistettiin juuri ennen käyttöä laimentamalla varastoliuosta PBS:llä siten, että lopulliseksi propidiumjodidi-pitoisuudeksi tuli 0,2 µg/ml. Lymfokiinikäsittelyn jälkeen solut pestiin kerran 10 % FBS:ää sisältävällä RPMI 1640:llä ja suspendoitiin 1 ml:aan propidiumjodidikäyttöliuosta, inkuboitiin 5 min huoneen lämpötilassa ja analysoitiin sitten virtausytometrillä.

Fluoresenssimittaukset

Sekä FDA:lle että propidiumjodidille käytetty eksitaatioaallonpituus oli sama, 488 nm teholla 400 mW. Pitdemmät aallonpituudet läpäisevät 515 ja 520 nm:n optiset lasisuodattimet asetettiin fluoresenssidetektorin valomonistinputken eteen. Analysoitaessa propidiumjodidileimat-
tuja näytteitä sijoitettiin lisäksi punainen dikroinen lisäsuodatin (Corion Corp., Hollister, MA) valomonistinputken eteen. Väliaineella käsiteltyjä K562-soluja käytettiin virtausytometrin hienosäätöön ennen kutakin koetta. Virta ja valomonistinputken jännite säädettiin siten, että 90 % analysoiduista 1×10^4 solusta osui ennalta määrätyle kanava-alueelle koko 256 kanavan asteikolla. Tämä tehtiin kullekin 3 parametrille (valon sironta kapeassa kulmassa eteenpäin, fluoreseiinifluoresenssi ja propidiumjodidifluoresenssi), joita tutkittiin tässä tutkimuksessa. Väliaineella käsitellyille vertailusoluille sironta ja fluore-

seinifluoresenssi säädettiin kanava-alueen yläosaan ja propidiumjodidifluoresenssi alempaan osaan lymfokiinikäsitellyissä soluissa tapahtuvien vastaavien siirtymien mittaamiseksi. Kunkin K562-solunäytteen käsittelyn yhteydessä
5 analysoitiin 2×10^4 solua, ja laskettiin ennalta määrätylle markkerialueelle osuvien solujen prosenttiosuus. Tämä prosenttiosuus vähennettiin sitten väliaineella käsitel-
lyille soluille saadusta prosenttiosuudesta (noin 90 %), jolloin tulokseksi saatiin näytteen prosentuaalinen muutos.
10 Prosentuaaliset muutokset olivat alueella noin -5 - +70 %. Muutos positiiviseen suuntaan osoittaa lymfokiinikäsitte-
lyn aikaansaamaa vaikutusta K562-soluihin mitattavan para-
metrin suhteen (katso kuva 10).

Esimerkki 2

15 Leukoreguliinia erittävien ihmisen B-solulinjojen ja hydridomien tuotanto
Syöpäpotilaat immunisoitiin ihonsisäisesti heidän omilla irrotetuilla kasvainsoluilla, jotka oli säteilytetty annoksella 20 000 rad ja sekoitettu 10^7 elävään BCG-
20 soluun. Näiden potilaiden valtimoverestä preparoituja perifeerisiä veren lymfosyyttejä sekoitettiin hiiren NS-1-myeloomasoluihin suhteessa 3 PBL:ää yhtä myeloomasolua kohden, sentrifugoitiin ja suspendoitiin 100 μ l:aan seerumitonta alustaa. Solupellettiin lisättiin pisaroittain
25 1 ml minuutissa polyetyleeniglykolia (50 %, m/V), joka oli esilämmitetty 37 °C:seen, liikuttaen putkea koko ajan. Kaksi kertaa edellä mainittu tilavuus esilämmitettyä seerumitonta alustaa minuutissa lisättiin solususpensioon, kunnes 50 ml:n putki täyttyi. Soluja pelletoitettiin 15 min
30 kierrosnopeudella 800 min^{-1} . Sitten solut suspendoitiin varovasti HT-alustaan (DMEM, joka sisältää 20 % naudan sikiöseerumia, 13,6 $\mu\text{g/ml}$ hypoksantiinia ja 3,9 $\mu\text{g/ml}$ tymidiiniä) pitoisuudeksi $2,5 \times 10^6$ solua/ml (solumäärä ennen fuusiota), ja laitettiin 100 μ l seosta kuhunkin mikro-
35 maljan syvennykseen. 24 tunnin kuluttua lisättiin kuhunkin

syvennykseen 100 µl HAT-alustaa (HT-alusta, joka sisältää 0,18 µg/ml aminopteriiniä). Puolet alustasta korvattiin joka kolmantena päivänä tuoreella HAT-alustalla. Kun soluja oli pidetty 14 vrk yllä Hat-alustassa, ylläpidettiin niitä vielä kaksi viikkoa HT-alustassa, minkä jälkeen soluja kasvatettiin MEM-alustalla, joka sisälsi 20 % naudan sikiöseerumia.

PBL:ien viljelyä yhdessä myeloomasolujen kanssa voidaan vaihtoehtoisesti käyttää transformoitujen diploidisten B-solujen kehittämiseen.

PBL- ja myeloomasolut sekoitettiin (suhteessa 3:1), pelletoitettiin kierrosnopeudella 800 kierr./min ja valikoitiin HAT-alustassa edellä kuvatulla tavalla.

Hybridomien tai transformoitujen diploidisten B-solujen supernatanteista tutkittiin niiden erittämä leukoreguliini käyttämällä mikrokoetta HT-29-solut kohdesoluna. Leukoreguliinia sisältäviä soluja lisättiin 10 % FBS:ää sisältävässä MEM:ssä, ja kun saavutettiin riittävät solumäärät, tehtiin kokeita leukoreguliinin optimituotannon olosuhteiden määrittämiseksi seerumittomassa alustassa. Solut suspendoitiin pitoisuudeksi 2×10^5 solua/ml RPMI 1640:ä, ja inkuboitiin 3 vrk 37 °C:ssa. Joissakin kokeissa viljelmiin lisättiin 10 ng tetradekanoyyliforboliase-taattia/ml leukoreguliinituotannon stimuloimiseksi. Supernatantit kerättiin, sentrifugoitiin kiihtyvyydellä 800 x g, ja niistä tutkittiin leukoreguliiniaktiivisuus.

Esimerkki 3

Monoklonaalisten vasta-aineiden valmistaminen solupinnan leukoreguliinireseptorille

Balb/c-hiiret immunisoitiin antamalla K-562-kalvoja ihonalaisesti 3 kertaa kahden viikon välein. Kukin hiiri sai 10^3 solua vastaavan määrän kalvoja, jotka preparaotiin homogenoimalla koneellisella teflonhomogenaattorilla, kirkastettiin sentrifugoimalla pienellä nopeudella ja kerättiin sitten ultrasentrifugoimalla kiihtyvyydellä 100 000 x

g 1 tunti. Kalvot sekoitettiin Freundin täydelliseen apu-
aineeseen kutakin rokotetta varten. Kolme päivää ennen
hybridisaatiota hiiriin injektoitiin vatsakalvonsisäisesti
K562-solukalvoja PBS:ssä. Fuusiopäivänä poistettiin per-
5 nat, erotettiin yksittäiset solut ja fuusioitiin ne suh-
teessa 3 pernasolua/l myeloomasolu PEG:n avulla. Fuusion
jälkeen valikoitiin hybridit viljelemällä niitä hypoksan-
tiinia, aminopteriiniä ja tymidiiniä sisältävässä alustas-
sa (10). Leukoreguliinireseptorin vasta-aineita tuottavat
10 pesäkkeet kloonattiin rajalaimennusmenetelmällä.

Biologista koetta, jolla mitataan leukoreguliinin
ohjaaman HT-29-solujen kasvun hidastumisen estoa, käytet-
tiin leukoreguliinireseptorien vasta-aineiden detektointi-
tiin. 2000 HT-29-solua siirrostettiin 0,1 ml:aan 10 %
15 FBS:ää sisältävää MEM:ää 96-syvennyksisen maljan syvennyk-
sissä. Lisättiin sellainen leukoreguliinimäärä 0,1 ml:ssa
alustaa, joka sai aikaan HT-29-solujen kasvun 50 %:sen
eston, ja sen jälkeen 25 µl tutkittavaa vasta-ainetta si-
sältävää supernatanttia. 3 vrk:n inkuboinnin jälkeen mi-
20 tattiin esto laskemalla läsnäolevat solut MTT-värjäyksen
avulla. Kaikkia näytteitä, joissa leukoreguliiniaktiivi-
suuden esto oli 25 % tai suurempi, pidettiin positiivisi-
na. Tämä koe perustuu siihen, että monoklonaalinen vasta-
aine sitoutuu leukoreguliinireseptoriin, mikä estää leuko-
25 reguliinin sitoutumisen ja sen myöhemmän kasvua estävän
aktiivisuuden.

Leukoreguliinireseptori-ilmentymisen määrä mitat-
tiin kolmella tavalla, joilla kaikilla saatiin leukoregu-
liinireseptoriin sitoutuvan monoklonaalisen vasta-aineen
30 prosenttiosuus. Immunifluoresenssikokeessa inkuboitiin
 2×10^5 solua monoklonaalisen vasta-aineen kanssa 1 tunti
37°C:ssa. Solut pestiin kahdesti, lisättiin fluoresoivaan
aineeseen liitettyä vuohen anti-hiiri-immunoglobuliinia
Kirkegard and Peiry Labs, Rockville, MD) ja inkuboitiin 30
35 min 4 °C:ssa. Solut pestiin, suspendoitiin 0,5 ml:aan

PBS:ää ja analysoitiin EPICS 5-virtaussytometrillä (Coulter Instruments, Hialeah, FL) käyttämällä 488-laserlinjaa vihreän fluoresenssin herättämiseen. ELISA ja RIA tehtiin muuten samalla tavalla, mutta ELISA:ssa käytetty konjuugaatti oli piparjuuriperoksidaasi - vuohen anti-hiiri-immunoglobuliini ja RIA:ssa ¹²⁵I-leimattu vuohen anti-hiiri-immunoglobuliini. Kvantitatiivinen ELISA-määritys tehtiin kolorimetrisesti mittaamalla hydrolysoituneen substraatin määrä ARTEK-automaattimittarilla. Kvantitatiivinen RIA-määritys tehtiin mittaamalla sitoutunut ¹²⁵I-merkkiaine LKB-gammalaskurilla (LKB Instruments, Rockville, MD) (katso taulukko 8).

Esimerkki 4

Potilaan kasvainsolujen leukoreguliiniherkkyyden mittaaminen klonogeenista agarkoetta käyttämällä Kasvainsoluilla on normaalisoluihin verrattuna ainutlaatuinen kyky kasvaa puolikiinteässä alustassa. Tämä kasvainsolujen ominaisuus antaa keinon määrittää kvantitatiivisesti syöpäläkkeiden vaikutus ihmisten poistettujen kasvainten juuri erotettuihin soluihin. Leikkauksessa saadut paksusuolikasvaimet hienonnettiin ja hajotettiin kollagenaasilla ja DNA:asilla, jolloin saatiin yksisolususpensio (11). Solut suspendoitiin 0,15 % agarialustaan sisältävään alustaan muuten Kernin (12) menetelmää noudattaen, mutta lisäten leukoreguliinia vaihteleviksi pitoisuuksiksi. Agar-alustaa suspendoituneina kasvavien kasvainsolupesäkkeiden kehittyminen tutkittiin kvantitatiivisesti 10-14 vrk:n inkuboinnin jälkeen (katso taulukko 9).

Esimerkki 5

Leukoreguliinigeenin kloonaukset

Kun leukoreguliini on määritetty sekä biologisesti että biokemiallisesti, ja kun siten on saatu aikaan menetelmät leukoreguliinin identifioimiseksi ja eristämiseksi, kuten edellä esitettiin, tehdään leukoreguliinin kloonaukset ja ilmentäminen käyttämällä tavanomaisia, kirjallisuudessa

laajasti kuvattuja lähestymistapoja ja toimintaohjelmia (esimerkiksi Maniatis et al., Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY, 1982). Nämä menettelyt ovat riippuvaisia herkästä biologisesta kokeesta, jota kuvattiin edellisissä esimerkeissä. Kun koe on kehitetty ja on määritetty leukoreguliini biologisesti ja biokemiallisesti, voidaan käyttää tavantomaisia yhdistelmä-DNA- ja kloonausmenetelmiä aminohapposekvenssiltään ja biologiselta aktiivisuudeltaan autenttisen luonnon leukoreguliinin tai sen biologisesti aktiivisen alayksikön kanssa indenttisen proteiinin tuottamiseksi E.colissa tai muissa soveltuvissa isäntäorganismeissa. Kloonausmenettelyn pääpiirteet esitetään kuvassa 11. Tämä menettely vastaa menetelmiä, joita on käytetty monille biologisesti tärkeille eukaryoottigeeneille, erityisesti ihmisen lymfokiiniä, lymfotoksiinia, vastaavalle geenille, joka ilmennettiin bakteereissa käyttämällä samanlaista toimintaohjelmaa kuin se, jota kuvaavat Gray, P.W. et al [Nature 312 (1984) 721]. Tämä artikkeli ja muut tässä esimerkissä mainitut artikkelit mainitaan tässä viitteenä kokonaisuudessaan.

Kloonausesimerkkiä voidaan käsitellä kuutena erillisenä vaiheena (katso kuva 11). Seuraavassa kuvataan kukin tällaisen vaiheen peruspiirteitä.

25 Vaihe 1

Biologinen tutkiminen, puhdistus ja biologinen karakterisointi

Tämä analyysi täytyy tehdä ennen ryhtymistä mihinkään kloonauksokeisiin. Näiden tutkimusten yksityiskohdat ovat tässä hakemuksessa esitettyjä tietoja. Kun nämä tiedot on saatu edellä esitetyllä tavalla, on mahdollista ryhtyä geenitekniisiin toimenpiteisiin.

30 Vaihe II

E.coli-geenikirjasto

35 Bakteerikloonien rakentaminen perustuu luonnon leu-

koreguliinilähteiden karakterisointiin. Koska tämä hakemus julkistaa menetelmän ihmisen perifeeristen veren leukosyyttien (PBL) toimesta tapahtuvan leukoreguliinituotannon stimuloimiseksi, täytyy näiden solujen sisältää leukoreguliinisynteesiä varten tarvittavaa geneettistä informaatiota, ja ne ovat ilmeinen leukoreguliinigeenien lähde. Käytämällä stimuloituja solupolylaatioita eristetään mRNA, joka sisältää leukoreguliini-mRNA:ta. Tätä PBL-mRNA:ta käytetään cDNA-kirjastojen muodostamiseen esimerkiksi E.colissa tai muissa isäntäorganismeissa.

Vaihe III

Biokemiallinen karakterisointi, aminohapposekvenssi
Kuten edellä kuvattiin, leukoreguliiniproteiini on karakterisoitu biokemiallisesti ja puhdistettu homogeeniseksi. Seuraava ratkaiseva vaihe on leukoreguliiniproteiinin aminohapposekvenssin määrittäminen tätä luonnonmateriaalia käyttämällä. Tämä työ, joka on välttämätön sen varmistamiseksi, että mahdollisesti saadut geenikloonit vastaavat autenttista leukoreguliinia, tehdään tavanomaisin biokemiallisin sekventointimenetelmin.

Vaihe IV

Geenien eristäminen immuunitutkimuksiin

Tämä lähestymistapa geenien eristämiseksi voidaan aloittaa välittömästi vaiheen II loppuunsaattamisen jälkeen. Tässä kokeessa on ratkaiseva reagenssi luonnon leukoreguliinin vasta-aine antileukoreguliini, joka voidaan valmistaa sen jälkeen, kun on puhdistettu riittävästi luonnon leukoreguliinia eläimien immunisoimiseksi. Tätä menetelmää, jota on käytetty menestyksellisesti erilaisten geenien etsimiseen E.coli-geenikirjastoista, kuvaavat Helfam, D.M. et al [PNAS 80 (1983) 31-35], ja Young, R.A. ja R.W. Dawis [NAS 80 (1983) 1194-1198].

Vaihe V

Geenien eristäminen DNA-koettimen avulla

Tämä on vaihtoehtoinen, ja laajimmin käytetty, me-

netelmä geenien eristämiseksi E.coli-yhdistelmä-DNA-kirjastosta. Kuten Noyes et al. [NAS 76 (1979) 1770-1774] alunperin esittivät, käytetään synteettistä olideoksinukleotidikoetinta eukaryoottisen mRNA:n eristämiseen ja karakterisointiin. Koetin on pieni osa leukoreguliinia koodaavasta DNA-jaksosta, joka valmistetaan määrittämällä ensin luonnon proteiinin jokin aminohappo-osasekvenssi ja syntetisoimalla sitten nukleotidisekvenssi, joka koodaa tätä aminohappo-osassekvenssiä. Synteettinen nukleotidisekvenssi voidaan valmistaa esimerkiksi kemiallisesti, kuten Itakura, K. et al. [J.Am.Chem.Soc. 97 (1975) 7326] kuvaavat. Gastriinista peräisin olevaa aminohapposekvenssiä Trp-Met-Glu-Glu käytettiin esimerkiksi määrittämään dodekanukleotidi d(CTCCTCCATCCA), joka hybridisoituu spesifisesti gastriini-mRNA:han. Leukoreguliinin ollessa kyseessä käytetään samalla tavalla synteettistä DNA-fragmenttia koettimena, joka hybridisoituu leukoreguliinia tuottavista soluista saatuun luonnon mRNA:han. Käyttämällä esimerkiksi tunnistusjaksoa ja tavanomaisia menetelmiä erotetaan esimerkiksi leukoreguliinia vastaava mRNA RNA-seoksista. Näissä menettelyissä käytettäviä menetelmiä käsitellään julkaisussa Maniatis et al., supra; Goodman et al., US-patenttijulkaisut 2 283 489 ja 4 363 877 sekä niissä annetuissa viitteissä.

Näiden tulosten laajenuksena on ollut tällaisten koettimien käyttö cDNA-kirjastojen tutkimisessa [Crea, R. ja Horn, T., Nuc Acid Res 8 (1980) 2331-2348]. Vähän aikaa sitten käytettiin tetradekanukleotidiryhmää
d(TC A CA A TA C TCCA), joka oli ennustettu aminohappo-
 G G T
venssin Trp-Glu-Tyr-Cys-Asp perusteella, ihmisen kudostyyppiplasminogeenin aktivaattoria vastaavan geenin cDNA:n kloonien havaitsemiseen E.colissa [Pennica, D. et al., Nature 301 (1983) 214-220].

35

Vaihe VI

Geenin kokoaminen, ilmentäminen mikrobissa

Kloonauksen viimeisenä vaiheena on eukaryootin rakennegeenin muuttamattoman kopion rutiininomainen kokoaminen ja geenin luenta, jolloin syntyy leukoreguliinia tai sen biologisesti aktiivista alayksikköä. Menettely tämän geenin mikrobissa ilmentymisen aikaansaamiseksi geeniteknikan menetelmin etenevät erilaisia reittejä eri isännille. Vaikka erilaiset mahdollisuudet vektorin valmistamiseksi, isäntäsolun transformoimiseksi ja luennan ja ilmentymisen aikaansaamiseksi ovat liian lukuisat luetteloitaviksi, ovat menettelyt tavanomaisia, ja niitä on käsitelty lukuisissa katsauksissa kuten esimerkiksi Maniatis et al., supra, Gene Amplification and Analysis: Expression of Cloned Genes in Prokaryotic and Eukaryotic Cells, toim. Papas, T.S., Rosenberg, M. ja Chirikjian, J.G., Elsevier Science Publishing Co., Inc., NY. 1983, Berman et al., US-patenttijulkaisu 4 503 142, sekä niissä annetuissa viitteissä.

Voidaan lisäksi syntetisoida leukoreguliinin tai sen biologisesti aktiivisen alayksikön muunnettu muoto, jonka molekyyli­rakenteessa voi olla modifikaatioita. Tällaisella muunnetulla leukoreguliinilla voi olla parantunut käyttökelpoisuus, kuten parantunut teho, pienentyneet sivuvaikutukset tai parantunut stabiilisuus; tai sillä voi olla yhtä suuri aktiivisuus tai pienempi, mutta riittävä, aktiivisuus kuin leukoreguliinille on ominaista. Kuitenkin kaikissa tapauksissa, joissa molekyyli­rakente ja aktiivisuus ovat suuremmalta osin samat kuin tässä määritellyllä leukoreguliinilla, on tuotetta pidettävä sitä vastaavana tai sen normaalina muunnoksena.

Kuvien ja taulukoiden kuvausKuva 1

Ihmisen kasvainsolujen sytolyysi, jonka saavat aikaan leukoreguliinia sisältävä ihmisen PBL-lymfokiini

(O -- O) ja puhdistettu 1788-solulinjan lymfotoksiini (● — ●) vastaavina lymfokiinipitoisuuksina. Näytteiden keskiarvojen standardipoikkeama oli korkeintaan 2 %.

5 Ihmisen lymfokiinilla ja lymfotoksiinilla oli kuitenkin pieni tai olematon sytolyttinen vaikutus ihmisen leukemia-, sarkooma- ja karsinoomasoluja kohtaan. Korkeintaan 50 %:inen RPMI 2650-karsinoomasolujen hajoaminen havaittiin lymfokiininäytteellä, joka sisälsi 1000 yksikköä lymfotoksiinia/ml.

10 Kuva 2

Ihmisen kasvainsolujen kasvun esto, jonka saivat aikaan leukoreguliinia sisältävä ihmisen lymfokiini (O -- O) ja puhdistettu 1788-solulinjan lymfotoksiini (● — ●) yhtä suurina lymfotoksiinipitoisuuksia. Näytteiden keskiarvojen keskihajonta oli korkeintaan 5 %. Prosentuaalinen kasvun esto määritettiin käyttämällä solulaskentakoetta.

20 Hyvin puhdas 1788-solulinjan lymfotoksiini ei onnistunut hajottamaan mitään näistä kolmesta kasvainsolutyypistä. Huolimatta alhaisesta lyyttisestä vaikutuksestaan ihmisen kasvainsoluihin, aiheutti ihmisen lymfokiini ihmisen kasvainsolujen kasvun merkittävän eston. Puhdistettu 1788-solulinjan lymfotoksiini inhiboi kuitenkin kasvua merkittävästi vain pitoisuuksina 500 ja 1000 lymfotoksiiniyksikköä/ml. Kasvun estyminen näillä pitoisuuksilla olisi lisäksi voinut hyvinkin aiheutua ammoniumkarbonaattipuskurin, pH 8,4, jossa puhdistettu lymfotoksiini valmistettiin, kasvua hidastavasta vaikutuksesta.

25 Kuva 3

30 Kohdesolujen herkyyden NK-välitteiselle sytotoksiisuudelle lisääntyminen, jonka saa aikaan leukoreguliinia sisältävä ihmisen lymfokiini, mutta ei puhdistettu ihmisen lymfotoksiini. Ihmisen lymfokiiniä, joka sisälsi 40 lymfotoksiiniyksikköä/ml (O -- O), puhdistettua 1788-lymfotoksiinia pitoisuutena 40 yksikköä/ml (● — ●) tai väli-

35

ainetta (Δ -- Δ), inkuboitiin 30 min kohdesolujen kanssa ennen NK-efektorisolujen lisäämistä. Näytteiden keskiarvojen keskipoikkeama oli korkeintaan 1 %.

5 Kasvainsolujen proliferaation eston lisäksi ihmisen lymfokiini, mutta ei puhdistettu 1788-lymfotoksiini, lisäksi ihmisen karsinoma-, leukemia- ja sarkoomasolujen herkkyyttä NK-välitteiselle sytotoksisuudelle. Ihmisen lymfotoksiini aiheutti jopa RPMI 2650-karsinomasolujen, jotka ovat resistenttejä NK-hajotukselle, hajoamisen. Puhdistettu 1788-lymfotoksiini ei edistänyt karsinoma-, leukemia- tai sarkoomasolujen herkkyyttä NK:n aiheuttamalle hajoamiselle. Fraktioimattoman, lymfokiiniä sisältävän, ihmisen PBL-lymfotoksiinin ja puhdistetun 1788-solulinjan lymfotoksiinin erilaiset biologiset vaikutukset viittaavat 15 siihen, että muu lymfokiini kuin lymfotoksiini välittää kasvainsolujen vastaiset vaikutukset.

Kuva 4

20 Kahden erilaisen ihmislymfokiinivalmisteen geeliläpaisevyys-HPLC. Kahden ml:n näytteitä eluoitiin isokraattisesti Toyasoda TSK G-3000 SWG-kolonnista 20 mM Na-fosfaattipuskurilla, pH 7,4, joka sisälsi 0,1 % PEG:tä. Kerättiin neljän ml:n fraktioita, laimennettiin niitä satakertaiseen laimennukseen asti ulottuvalla alueella 10 % FBS:ää sisältävällä RPMI 1640:llä, ja tutkittiin alfa-L929-solujen lymfotoksiinisytolyysi ja ihmisen K562- ja 25 2650-kasvainsolujen leukoreguliinisytostaasi. Proteiinin absorbanssikäyrä aallonpituudella 280 nm eritetään alfa-L929-koetta kuvaavassa osassa.

30 Ihmisen PBL-lymfotoksiinin ja leukoreguliinin näennäistä molekyylipainoa tutkittiin HPLC-molekyylliseulakromatografialla. Pääosa lymfotoksiiniaktiivisuudesta eluoi-
tui fraktioissa, jotka olivat molekyyllipainoalueella
30 000 - 40 000. Eri yksilöistä peräisin olevissa näyt-
teissä esiintyi kuitenkin jonkin verran vaihtelua; jois-
35 sakin näytteissä oli lymfotoksiiniaktiivisuutta myös mole-

kyylipainoalueilla 50 000 - 70 000 ja 12 000 - 20 000. Leukoreguliiniaktiivisuus eluoitui fraktioissa, jotka olivat molekyylipainoalueella 50 000 - 70 000, vähäisen komponentin osuessa molekyylipainoalueella 10 000 - 15 000.

5

Kuva 5

Leukoreguliinin polyakryyliamidigeelielektroforeesi lineaarista gradienttia käyttäen. Tarkempi arvo leukoreguliinin molekyylipainolle määritettiin grafiennäköisillä polyakryyliamidigeelielektroforeesilla. Yhtä millilitraa ihmisleukoreguliini-valmistetta käsiteltiin elektroforeettisesti yön yli. Sitten geeli viipaloitiin, ja viipaleita eluoitettiin yön yli 10 % FBS:ää sisältävällä MEM:llä 37 °C:ssa. Leukoreguliiniaktiivisuus (avoimet renkaat) mitattiin käyttämällä mikrokoetta, jossa kohteina olivat HT-29-karsinoomasolut. Leukoreguliini kulki yhdessä proteiinien kanssa, joiden molekyylipainot olivat alueella 110 000 - 140 000. Tässä kuvassa näkyy myös ¹²⁵I-leimatun (täytetyt renkaat) leukoreguliinin, joka oli puhdistettu peräkkäisillä HPLC-geelisuodatuksella, ioninvaihtokromatografialla ja lineaarigradiennäköisillä polyakryyliamidigeelielektroforeesilla, elektroforeettinen käyrä.

10

15

20

Kuva 6

Puhdistetun leukoreguliinin geelisuodatus

Käytettiin vaihtoehtoista menetelmää molekyylipainon määrittämiseksi, jossa käytettiin Pharmacia S-300-geelisuodatusta. HPLC-geelisuodatuksella, ioninvaihtokromatografialla ja lineaarigradiennäköisillä polyakryyliamidigeelielektroforeesilla puhdistettu leukoreguliini leimattiin ¹²⁵I:lla ja eluoitettiin S-300-kolonnilla käyttämällä 10 nM NaPO₄-puskuria, pH 7,4, joka sisälsi 1,0 mol/l NaCl:a. Puhdistetun leukoreguliinin näennäinen molekyylipaino oli 120 000 - 140 000 tällä menetelmällä määritettynä.

25

30

35

Kuva 7

Natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeeli-
elektroforeesi

¹²⁵I:lla leimattu, puhdistettu leukoreguliini käsi-
5 teltiin elektroforeettisesti natriumdodekyylisulfaattipo-
lyakryyliamidigeelielektroforeesilla sen määrittämiseksi,
hajoaisiko luontainen proteiinin alayksiköiksi ollessaan
alttiina denaturoiville olosuhteille. Leukoreguliini liik-
kui elektroforeesissa yhdessä molekyylien kanssa, joiden
10 molekyylipaino oli 30 000 - 35 000, kuten tästä geelin
autoradiogrammista näkyy.

Kuva 8

Kahden erilaisen ihmislymfokiinivalmisteen isoelek-
trinen fokusointi. Kahden millilitran näytteitä fokusoi-
15 tiin pH-gradientissa 3,5 - 10. Kerättiin kolmen millilit-
ran fraktioita, määritettiin kunkin fraktion pH, yhdistet-
tiin peräkkäiset 0,5 pH-yksikön sisään jäävät fraktiot,
dialyysisuodatettiin ne PBS-PEG:tä vastaan, steriloitiin
suodattamalla, laimennettiin satakertaiseen laimennukseen
20 asti ulottuvalla alueella, ja tutkittiin lymfotoksiinin
sytolyyttinen vaikutus alfa-L929-soluihin (● — ●) tai
leukoreguliinin sytostaattinen vaikutus K562- (□- -□) ja
OST- (O -- O) soluihin.

Vaikka ihmisen lymfotoksiini- ja leukoreguliiniak-
25 tiivisuudet olivat osittain päällekkäisiä tehtäessä erotus
molekyyliseuloilla, voitiin nämä kaksi aktiivisuutta erot-
taa toisistaan molekyylien varauksien erojen perusteella.
Lymfotoksiinin isoelektrinen pH oli 6,5 - 7,2. Leukoregu-
liinilla oli kaksi isoelektristä pH:ta, toinen 5,0 - 5,8
30 ja toinen 7,5 - 8,3.

Kuva 9

Leukoreguliinin ja lymfotoksiinin HPLC-ioninvaihto-
kromatografia. Kahden millilitran ihmislymfokiinivalmiste-
näytteitä erotettiin DEAE-545-HPLC-kolonnilla eluoimalla
35 lineaarisella NaCl-gradientilla 0-0,5 mol/l. Fraktiot ste-

riloitiin suodattamalla ja niistä tutkittiin leukoreguliini käyttämällä mikrokoetta ja HT-29-kohdesoluja tai lymfotoksiini. Leukoreguliini eluoitui NaCl-pitoisuudella 0,1 mol/l ja erottui lymfotoksiinista, joka eluoitui NaCl-pitoisuudella 0,15 mol/l.

Kuva 10

Leukoreguliiniaktiivisuuden virtaussytometrinen analyysi

Leukoreguliinin toista biologista vaikutusta, joka voi liittyä sen toimintamekanismiin, arvioitiin virtaussytometrisellä analyysillä. K562-solujen tilavuuden tai kalvon läpäisevyyden muutokset, jotka ovat havaittavissa muutoksina pienessä kulmassa tapahtuvassa valon eteenpäin siroamisessa (0) tai fluoreseiinidiasetaatin (\square) tai propidiumjodidin (Δ) fluorokromasiassa, arvioitiin käyttäällä 488 nm:n laserlinjaeksitaatiota FACS IV-virtaussytometrisä. Ylemmässä kuvassa K-562-soluja käsiteltiin lymfokiini-valmisteella, joka sisälsi 10(---), 40(-'-) tai 100(--'--) yksikköä dialyysisuodatettua lymfotoksiinia tai 500 (-'---) yksikköä alfainterferonia, 0 - 6 tuntia solujen lymfokiinivasteen selvittämiseksi.

Kun K562-soluihin lisättiin lymfokiiniä, aleni valon siroaminen eteenpäin pienessä kulmassa soluista, propidiumjodidin fluorokromasia lisääntyi, ja FDA:n fluorokromasia aleni. Muutos pienessä kulmassa tapahtuvassa valon eteenpäin siroamisessa heijasti muutosta solun koossa ja/-tai muodossa; solutilavuuden kasvu vahvistettiin tekemällä solutilavuusanalyysi Model ZBl Coulter Counter-laitteella, johon oli lisätty Accucomp-solutilavuusanalyysiohjelma (Coulter Instruments, Inc., Hialeah, FL). FDA:n fluorokromasian pieneneminen heijasti kalvon läpäisevyyden lisääntymistä, koska fluoresoivaa solunsisäistä fluoreseiinia vapautuu solusta. Propidiumjodidin fluorikromasia lisääntyminen heijasti myös kalvon läpäisevyyden lisääntymistä, koska propidiumjodidia tuli soluun ja liittyi nukleiini-

happoon. Ihmisen lymfokiinin aiheuttamat virtaussytometriset muutokset olivat havaittavissa 30 min:n kuluttua K562-solujen käsittelystä ja olivat suurimmillaan viimeistään kahden tunnin kuluttua. Alfainterferoni ei indusoinut tämän ajan kuluessa mitään muutoksia solun pinnan rakenteessa tai plasmakalvon läpäisevyydessä. Alemmassa kuvassa K562-soluja käsiteltiin isoelektrisessä HPLC-fokusoinnissa saaduilla fraktioilla (näytteiden numerot taulukossa 4) 2 tuntia, ja mitattiin muutos valon siroamisessa (—) ja fluoreseiinidiasetaatin (- . -) ja propidiumjodidin (...) fluorokromasiassa. Lymfokiinin vaikutusta solurakenteeseen ja kalvon läpäisevyyteen esiintyi vain niissä leukoreguliinifraktioissa, jotka oli puhdistettu HPLC:lla ja isoelektrisellä fokusoinnilla. Fraktiot, jotka sisälsivät runsaasti lymfotoksiinia tai interleukiineja ja interferonia, eivät saaneet aikaan havaittavissa olevia muutoksia solujen rakenteessa tai plasmakalvon läpäisevyydessä.

Kuva 11

Leukoreguliinigeenin kloonaus

Tämä juoksukaavio esittää leukoreguliinigeenin kloonauksen kuutta eri vaihetta (katso esimerkki 5).

Taulukko 1

Normaalien ihmisen perifeeristen veren leukosyyttien tai ihmisen B-solulinjojen, joita muodostui hiiren myeloomasolujen kanssa tehdyn hybridisaation jälkeen tai transformoitui spontaanisti viljelmässä, leukoreguliinituotannon optimiolosuhteita tutkittiin. Suurimmat perifeeristen veren leukosyyttien tuottamat leukoreguliinitasot havaittiin, kun näitä soluja viljeltiin 48 tuntia alustassa, joka sisälsi 5 µg PHA:ta/ml. Ihmisen jatkuvat B-solulinjat tai ihmisen B-solu-hiirenmyelooma-heterohybridomat tuottivat leukoreguliinia jatkuvasti kolmen vrk:n ajan, kun niitä kasvatettiin seerumivapaassa RPMI-1640-alustassa. Tetradekanoyyliforboliasetatin lisääminen alustaan pitoisuudeksi 10 µg/ml kasvatti leukoreguliinituotannon kolminkertaiseksi.

Taulukko 2

Osoitus ainutlaatuisen kasvaintenvastaisen lymfokiinin, joka on eri aine kuin lymfotoksiini, läsnäolosta saatiin, kun verrattiin lymfotoksiinin (alfa-L929-sytolyttinen aktiivisuus) ja ihmisen kasvainsoluille sytostaattisen aktiivisuuden suhteellisia osuuksia 6 eri yksilöstä peräisin olevissa lymfokiinivalmisteissa. Sytolyttinen vaikutus hiiren kasvainsoluihin ja sytostaattinen vaikutus ihmisen kasvainsoluihin vaihteli riippumattomasti näissä valmisteissa, mikä osoittaa, että nämä kaksi biologista vaikutusta olivat selvästi erilaisten aineiden välittämiä. Kolmen yksilön leukosyyttien, joita ei stimuloitu PHA:lla tai joihin lisättiin PHA:ta viljelyn viimeisen puolituntisen ajaksi, tuottamat konsentroidut lymfokiinit eivät hajottaneet mitään kasvainsoluja, eikä niillä ollut kasvua estävää vaikutusta. Kun samoja leukosyyttejä stimuloitiin PHA:lla 24 tuntia, ne erittivät kuitenkin merkittäviä määriä hajottavia ja kasvua estäviä aktiivisuuksia. Kasvainsolujen vastaisia vaikutuksia eivät siis saaneet aikaan PHA, puskuri tai alustan ravintoaineiden loppuun kuluminen 24 tuntia kasvatettujen solujen ollessa kyseessä.

Taulukko 3

Lisätukea uuden lymfokiinin, josta tästedes käytetään nimitystä leukoreguliini ja joka on eri aine kuin lymfotoksiini, läsnäololle antoi sytolyyttisen aktiivisuuden ja kasvainsolujen kasvua estävän lymfokiiniaktiivisuuden neuramidaasi- ja proteaasipilkkoutumisherkkyyden tutkiminen. Ihmisen lymfokiinin sytolyttinen vaikutus alfa-L929-soluihin (lymfotoksiini) aleni 49 ja 92 % 0,2 ja 0,4 neuramidaasiyksikön vaikutuksesta ilman että esiintyi merkittävää lymfokiinin kasvainsolujen kasvua estävän (leukoreguliini) vaikutuksen estymistä. Neuramidaasipilkkomisella sialiini-hapon (10 mmol/l) läsnäollessa ei ollut vaikutusta kumpaankaan aktiivisuuteen, mikä sulkee pois sen

mahdollisuuden että vaikutuksen lymfotoksiiniin olisi saanut aikaan neuramidaasissa esiintyvät kontaminoivat proteaasit. Toisaalta proteaasit estivät sekä lymfotoksiini-että leukoreguliiniaktiivisuutta, vaikka eri asteisesti.

5 Kuusi yksikköä pronaasia tuhosi täydellisesti lymfotoksiiniaktiivisuuden, kun taas näytteen leukoreguliiniaktiivisuudesta säilyi 52 %. Pilkkominen pronaasilla sai siis aktiivista ihmisen leukoreguliinia sisältävän näytteen vapaaksi lymfotoksiinista.

10 Syyriankultahamsterin lymfotoksiinivalmisteet sisälsivät myös leukoreguliinityypistä aktiivisuutta hamsterin kasvainsolujen suhteen, ja antikarsinogeenista aktiivisuutta (24). Antikarsinogeenista aktiivisuutta ei ole mitattu ihmisten lymfokiinivalmisteista, koska ei ole saatavilla kvantitatiivista ihmissolujen muuttumiskoetta, joka olisi verrattavissa vastaavaan hamsterikokeeseen (4).

15 Pyrimme määrittämään sen, olisivatko hamsterin lymfotoksiini- ja leukoreguliiniaktiivisuudet erotettavissa niiden neuramidaasi - ja proteaasipilkkoutumisherkkyyden perusteella, kuten ihmisen lymfotoksiini ja leukoreguliini olivat. Määritimme myös sen, puhdistuiko antikarsinogeeninen aktiivisuus yhdessä leukoreguliinin kanssa, jotta voitaisiin todeta, ovatko hamsterin antikarsinogeeninen aktiivisuus ja leukoreguliini identtisiä ja siitä syystä mahdollisesti identtiset myös ihmisissä. Samoin kuin ihmisen

25 lymfotoksiinin ollessa kyseessä, neuramidaasi ja trypsiini hajottivat hamsterin lymfotoksiinia. Neuramidaasi ei pilkkonut antikarsinogeenista aktiivisuutta karsinogeenilla käsiteltyjen hamsterin solujen suhteen eikä hamsterin kasvainsoluihin kohdistuvaa sytostaattista aktiivisuutta, kuten ei ihmisleukoreguliiniakaan, mutta mainitut aktiivisuudet heikkenivät 42 % trypsiinin vaikutuksesta, mikä osoittaa leukoreguliinin ja lymfotoksiinin samansuuntaisen keskenään erilaisen herkkyyden neuramidaasi- ja proteaasipilkkoutumiselle näissä kahdessa lajissa.

30

35

Taulukko 4

Tehtiin kaksivaiheinen fraktiointi, joka perustui molekyylirikokoja poissulkevaan HPLC:hen ja isoelektriseen fokuointiin, sen määrittämiseksi, oliko ihmisen leukoreguliinin syövävastainen aktiivisuus erotettavissa ja eri aine kuin monet muut lymfokiinit ja monokiinit. Kuten aiemmista tuloksista ennustettiin, lymfokiiniaktiivisuutta esiintyi korkeita (45 000 - 74 000), keskinkertaisia (30 000 - 38 000) ja pieniä (17 000 - 20 000) molekyylipainoja sisältävissä fraktioissa, ja se rikastui fokuoinnin jälkeen pH-fraktioon 6,0 - 6,8. Leukoreguliinia esiintyi vain molekyylipainoltaan suuressa materiaalissa, ja se erottui kahdeksi lajiksi, joiden isoelektriset pH:t olivat 4,2 - 5,6 ja 7,1 - 8,4. Vaikka fraktiot, joihin leukoreguliini oli rikastunut, sisälsivät jonkin verran lymfotoksiiniaktiivisuutta, sisälsivät fraktiot 1 ja 3 enemmän kuin 170 lymfotoksiiniyksikköä, mutta ei leukoreguliiniaktiivisuutta. Siksi stimuloituista ihmisen PBL:istä peräisin oleva lymfotoksiiniaktiivisuus voidaan erottaa leukoreguliinista. Pienten molekyylipainojen fraktio sisälsi interleukiini 1 ja interleukiini 2 -aktiivisuudet kokonaan ja pääosan interferoniaktiivisuudesta. Missään fraktiossa ei havaittu makrofageja aktivoivaa aktiivisuutta. Kaikki fraktiot sisälsivät myös endotoksiinia. Endotoksiinin määrä ei korreloinut leukoreguliiniaktiivisuuden kanssa. Lisätodisteena siitä, että endotoksiini ei ole leukoreguliiniaktiivisuuden välittäjä, oli se, että lipopolysakkaridiserotyypin 0,55:B5 ja 0111:B4 lisääminen jopa pitoisuuksina 20 ng/ml ei estänyt K562-solujen kasvua.

Taulukko 5

Koska fraktiot, joihin leukoreguliini oli rikastunut, sisälsi pieniä pitoisuuksia interferonia, tehtiin lisäkoel sen määrittämiseksi, missä määrin interferoni saattaisi edesauttaa kasvainsolujen kasvun estoa. Eräästä lähteestä (ML) saatu gammainterferoni ei hajottanut alfa-

L929-soluja eikä estänyt ihmisen K562-kasvainsolujen kasvua. Eräästä toisesta lähteestä (FL) saatu gammainterferoni sisälsi 2000 lymfotoksiiniyksikköä/ml, mutta ei leukoreguliiniaktiivisuutta. Alfainterferoni ei sisältänyt lymfotoksiinia eikä leukoreguliinia. Leukoreguliiniaktiivisuus ei siis ole alfa- tai gammainterferonin välittämä eikä tulos lymfotoksiinin ja gammainterferonin synergistisestä vaikutuksesta.

Taulukko 6

10 Fraktioimattomat lymfokiinivalmisteet sisältävät aktiivisuutta, joka edistää kasvainsolujen herkkyyttä NK-välitteiselle sytotoksisuudelle. Kohdesoluja leukoreguliinille ja lymfotoksiinille herkistävien aktiivisuuksien suhdetta tutkittiin ihmisen lymfokiinillä, joka oli fraktioitu peräkkäin HPLC:llä ja isoelektrisellä fokusoinnilla. 15 Fraktiot, joihin leukoreguliini oli rikastunut, sisälsivät merkittävää kasvainsolujen vastaista NK-sytotoksisuutta edistävää aktiivisuutta. Fraktiot, joihin lymfotoksiini oli rikastunut, ja ne, jotka sisälsivät molekyyli- 20 painoltaan pienempiä lymfokiinejä, kuten interferonia, eivät lisänneet K562-leukemiasolujen herkkyyttä NK-välitteiselle sytotoksisuudelle. Siten NK:ta tehostava aktiivisuus puhdistuu yhdessä leukoreguliinin tai on identtinen sen kanssa.

Taulukko 7

25 Joukosta ihmisen kasvain- ja normaalisoluja tutkittiin herkkyyys leukoreguliinille. Ruuansulatuskanavan karsinoomien todettiin olevan ryhmänä hyvin herkkiä leukoreguliinille. Leukoreguliini ei vaikuttanut haitallisesti 30 normaalien paksusuolen limakalvosolujen eikä ihon fibroblastien kasvuun.

Taulukko 8

35 Solupinnan leukoreguliinireseptorien monoklonaalisten vasta-aineiden sitoutumisen kvantitatiivinen määrittäminen antaa ennusteen solun suhteellisesta herkkyydestä

leukoreguliinin kasvua estäville vaikutuksille. Anti-leukoreguliinireseptorin vasta-aineet sitoutuivat merkittävästi 15 - 23 %:iin HT-29-soluista, mutta vain 2 %:iin kymmenen kertaa heikommin reagoivista K562-soluista, tässä epäsuorassa virtaussytometrissä immuunifluoresenssikokeessa.

Taulukko 9

Jotta saataisiin määritetyksi leukoreguliinin mahdollinen teho in vivo ihmisen syöpiin, preparoitiin juuri erotettuja paksusuolisyöpäsoluja ja viljeltiin niitä puoliikiinteässä, leukoreguliinia sisältävässä agaralustassa. Paksusuolisyöpä valittiin tutkimuskohteeksi paksusuolisyöpäsolulinjojen suuren leukoreguliiniherkkyyden takia. Kaikista neljästä potilaasta saatujen kasvainsolujen kasvu estyi annoksesta riippuvalla tavalla leukoreguliinin vaikutuksesta, vaikkakin vaihtelevassa määrin. 50 yksikköä leukoreguliinia esti 98 %:isesti erään potilaan soluja, kun taas 4000 yksikköä leukoreguliinia esti 42 %:isesti erään toisen potilaan soluja. Tämä viittaa siihen, että leukoreguliinilla on kyky hillitä ihmisen paksusuolisyöpien kasvua.

Kirjallisuusviitteet

1. Aggarwal, B.B., Moffat, B. ja Harkins, R.N., "Human lymphotoxin: production by a lymphoblastoid cell line, purification and initial characterization", J. Biol. Chem., 259 (1984) 686-691
2. Brouty-Boye, P., "Inhibitory effects of interferon on cell multiplication", Lymphokine Reports 1 (1980) 99-112
3. Brown, R.L., Griffith, R.L., Neubauer, R.H. ja Rabin, H., "The effect of T-cell growth factor on the cell cycle of primate T cells", J. Immunol. 129 (1982) 1849-1853
4. DiPaolo, J.A., "Relative difficulties in transforming human and animal cells in vitro", J. Natl. Cancer Inst. 70 (1983) 3-8

5. Dolbeare, F.A. ja Smith, R.E., "Flow cytoenzymology: Rapid enzyme analysis of single cells", teoksessa Flow Cytometry and Sorting, toim. M.R. Melamid, P.F. Myllanney ja M.L. Mindelsohn, John Wiley & Sons, New York, 1979, s. 317-334
6. Evans, C.H. ja DiPaolo, J.A., "Lymphotoxin: an anti-carcinogenic lymphokine as measured by inhibition of chemical carcinogen or ultraviolet-irradiation-induced transformation of Syrian hamster cells", Int. J. Cancer 27 (1981) 45-49
7. Evans, C.H. ja Heinbaugh, J.A., "Lymphotoxin cytotoxicity, a combination of cytolytic and cytostatic cellular responses", Immunopharmacology 3 (1981) 347-359
8. Evans, C.H., Heinbaugh, J.A. ja DiPaolo, J.A., "Comparative effectiveness of lymphotoxin anticarcinogenic and tumor cell growth inhibitory activities", Cell.Immunol. 76 (1983) 295-303
9. Granger, G.A. ja Kolb, W.P., "Lymphocyte in vitro cytotoxicity: mechanisms of immune and non-immune small lymphocyte mediated target L cell destruction", J.Immunol. 101 (1968) 111-116
10. Haspel, M.V., et al., Science 220 (1983) 304-306
11. Hoover, H.C., et al., Cancer Res., huhtikuu 1984
12. Kern et al., Int.J.Cancer 30 (1982) 725-729
13. Khan, A., et al., teoksessa Human Lymphokines, Academic Press, New York, 1982, s. 621-629
14. Kleinerman, E.S., Schroit, A.J., Fogler, W.E., ja Fidler, I.J., "Tumoricidal activation of human monocyte activity in vitro by free and liposome encapsulated human lymphokines", J. Clin. Invest. 72 (1983) 304-315
15. Laemmli, V., Nature 227 (1970) 680-685
16. Lambin, P., ja Fine, J.M., Anal. Biochem. 98 (1979) 160-168
17. McConahey, P.J. ja Dixon, F.J., Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 29 (1966) 185-189

18. Mizel, S.B., Oppenheim, J.J., ja Rosensteich, D.L., "Characterization of lymphocyte-activating factor produced by macrophage cell line P388D1. I. Enhancement of LAF production by activated T lymphocytes", J.Immunol. 120 (1978) 1497-1505
19. Papermaster, B.W., et al., teoksessa Lymphokines and Thymic Hormones, Academic Press, New York, s. 789-799
20. Penn, I., "Depressed Immunity and the Development of Cancer", Clinical Experimental Immunology 46 (1981) 459
21. Pross, H.F., Haines, M.G., Rubin, P., Shragge, P. ja Patterson, M.S., "Spontaneous human lymphocyte-mediated cytotoxicity against tumor target cells. IX. The quantitation of natural killer cell activity", J.Clin. Immunol. 1 (1981) 51-63
22. Rabin, H., Hopkins, R.F., Ruscetti, F.W., Neubauer, R.H., Brown, R.L. ja Kawakami, T.G., "Spontaneous release of a factor from a continuous line of primate tumor T cells", J. Immunol. 127 (1981) 1852-1856
23. Ransom, J.H. ja Evans, C.H., "Lymphotoxin enhances the susceptibility of neoplastic and preneoplastic cells to natural killer cells mediated destruction", Int. J. Cancer 29 (1982) 451-458
24. Ransom, J.H. ja Evans, C.H., "Molecular and biological characterization of Syrian hamster lymphotoxin's anti-carcinogenic and tumor cell growth inhibitory activities", Cancer Res. 43 (1983) 5222-5227
25. Ransom, J.H., Evans, C.H. ja DiPaolo, J.A., "Lymphotoxin prevention of diethylnitrosamine carcinogenesis in vivo", J. Natl. Cancer Inst. 69 (1982) 741-744
26. Ransom, J.H., Evans, C.H., Jones, A.E., Zoon, R.A. ja DiPaolo, J.A., "Control of the carcinogenic potential of ^{99m}technetium by the immunologic hormone lymphotoxin", Cancer Immunol. Immunother. 15 (1983) 126-130
27. Ransom, J.H., Pintus, C. ja Evans, C.H., "Lymphotoxin

- amplification of tumor cell growth inhibition is specific for natural killer cells but not for macrophages", *Int. J. Cancer* 32 (1983) 93-97
28. Ransom, J.H., Rundell, J.O., Heinbaugh, J.A. ja Evans, C.H., "Biological and physiocochemical characterization of keyhole limpet hemocyanin-induced guinea pig lymphotoxin", *Cell Immunol.* 67 (1982) 1-13
 29. Remold, H.G. ja Medhis, A.D., "Two migration inhibitory factors differ in density and susceptibility to neuraminidase and proteinases", *J.Immunol.* 122 (1978) 1920-1925
 30. Rosenberg, S.A., Henrichon, M., Coyne, J.A. ja David, J.A., "In vitro studies of LT produced in response to antigen stimulation of lymphocytes", *J.Immunol.* 6 (1973) 1623-1629
 31. Sawada, J., Shiori-Nakano, K., Osawa, T., "Cytotoxic activity of purified guinea pig lymphotoxin against various cell lines", *Jpn.J.Exp.Med.* 4 (1976) 263-271
 32. Trinchieri, G., DeMarchi, M., Mayer, W., Savi, M. ja Cappelletti, R., "Lymphocyte antibody lymphocytolytic interaction (LALI) with special emphasis on HLA", *Transplant. Proc.* 5 (1973) 1631-1646
 33. Trinchieri, G. ja Santoli, D., "Anti-viral activity induced by culturing lymphocytes with tumor-derived or virus-transformed cells", *J.Exp.Med.* 147 (1978) 1314-1333
 34. Williamson, B.D., Carswell, E.A., Rubin, B.Y., Prendergast, J.S. ja Old, L.J., "Human tumor neurosis factor produced by human-B-cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon", *Proc.Natl.Acad.Sci.* 80 (1983) 5397-5401

Taulukko 1

Optimaalisen leukoreguliinituotannon olosuhteet

Perifeerisen veren leukosyytit	Ihmisen B-solulinjat
Inkubointi-olosuhteet a) Tuotettu leukoreguliini (yksikköä/ml)	Inkubointi-olosuhteet b) Tuotettu leukoreguliini (yksikköä/ml)

24 tunnin viljely, läsnä:			
10 µg PHA/ml	8	6a3-1 ^c	RPMI-1640 10 % FBS 12
5 µg PHA/ml	45	1688 ^d	RPMI-1640 0,5
1 µg PHA/ml	0,1	1688	RPMI-1640+ 10 µg TPA/ml 1,5
10 µg PHA/ml			
24 tunnin viljelyssä:	8		
48 tunnin viljelyssä	205		
72 tunnin viljelyssä	120		

^a10⁶ PBL/ml RPMI 1640 ^b2x10⁵ solua/ml alustaa, 3 vrk 37°C:ssa

^cIhminen-hiiriheterohyridooma ^dIhmisen transformoitu diploidinen B-solu

Taulukko 2

Sytolyyttisten ja sytostaattisten aktiivisuuksien suhteelliset määrät eri yksilöistä saaduissa ihmislymfo-
kiinivalmisteissa

Valmiste	Alfa L929 sytolyytti- siä yksi- köitä/ml	K562 syto- staattisia yksiköitä/ml	Suhde ^a
HU-4	1 600	95	17
HU-8	10 000	8	1 250
HU-11	970	42	23
HU-12	5 000	4	1 250
HU-13	1 500	93	16
HU-17	5 400	20	270

^aSytolyyttisten yksiköiden suhde sytostaattisiin yksiköihin

Taulukko 3

Lymfotoksiini- ja leukoreguliiniaktiivisuuksien erilainen herkkyys neuramidaasi- ja proteaasipilkkoutumiselle

Käsittely^a Ihmisen lymfokiini

Syyrian hamsterin lymfokiini

	Koe I		Koe II		Alfa 1929 sytolyytti- sia yks./ml	Alfa 1929 sytolyytt. yks./ml	7997 syto- st. /ml	Antikarsino- geenisia yksiköitä/ml
	Alfa 1929 sytolyytti- sia yks./ml	K562 sytoostaat- tisia yks./ ml	Alfa 1929 sytol. yks./ml	K562 syto- st. /ml				
Alusta	358	10	5400	20	18	430	24	158
0,2 yksikköä VOM:a	181(49) ^b	10(0)				132(70) ^b	23(5)	150(5)
0,4 yksikköä VCN:a			450(92)	19(5)	17(6)			
PBS	560	25				2468	60	681
32 yksikköä trypsiiniä	25(96)	17(32)				471(81)	27(42)	392(42)
6 yksikköä kymotrypsiiniä	4(99)	16(36)						
6 yksikköä pronaasia	0(100)	13(48)						

a = 1 tunti 37°C:ssa b = Prosentuaalinen esto suluiissa

85867

Taulukko 4

Ihmissen lymfokiinin aktiivisuudet HPLC-fraktioiden ja isoelektrisen fokusoinnin jälkeen^a

	7	6	5	4	3	2	1
Molekyyli- paino	45,000-74,000	30,000-38,000	17,000-22,000				
Isoelektrinen pH	4,2- 5,6	6,0- 6,8	7,1- 8,4	4,2- 5,6	6,0- 6,8	7,1- 8,4	Ei fokusoitu
Fraktion nro	7	6	5	4	3	2	1
Aktiivisuus ^b							
Lymfotoksiini ^c	16	163	25	5	176	25	205
Leukoreguliini:							
on K562 ^d :lla	26	2	12	0	0	0	0
on 2650 ^e :lla	13	3	37	0	0	0	0
Interleukiini.1	0	0	0	0	0	0	160
Interleukiini-2	0	0	0	0	0	0	6000
Makrofaagien migraation esto	640	20	80	0	0	0	0
Makrofaagien aktivoituminen	0	0	0	0	0	0	0
Endotoksiini	20	8	10	14	11	10	5
Interferoni	25	10	10	0	5	5	250

(Taulukko 4, jatkoa)

- a = Kaksi ml ihmisen lymfokiinivalmistetta, joka sisälsi 750 lymfotoksiiniyksikköä ja 55 K562-sytostaattista leukoreguliiniyksikköä, erotettiin geeliläpäisy-kromatografiolla fraktioiksi, joiden molekyylipaino-alueet olivat 45 000- 74 000, 30 000-38 000 ja 17 000-22 000. Fraktio 17 000-22 000 pidettiin 4°C:ssa, kun taas kaksi korkeamman molekyylipainon fraktiota erotettiin edelleen isoelektrisellä fokusoinnilla pH-fraktioiksi 7,2-8,4, 6,1-6,9 ja 4,2-5,6. Fokusoinnin jälkeen yhdistetyt fraktiot dialysoitiin PBS-PEG:tä vastaan ja steriloiitiin suodattamalla ennen koetta.
- b = Kaikki aktiivisuudet ilmoitetaan yksikköinä/ml.
- c = Alfa-L929-solujen hajoaminen
- d = Kasvua estäviä yksiköitä
- e = Hajottavia yksiköitä
- f = ng/ml.

Taulukko 5

Interferonin kasvainsolujen vastaisen aktiivisuuden määrittäminen

Ihmisinterferoni tyyppi & lähde	Virusten vastaisia yksiköitä/ ml	Lymfotoksiini- yksiköitä/ml	Leukoreguliini- yksiköitä/ml
Gamma-(FL)	5×10^5 /ml	2000	0
Gamma-(ML)	5×10^5 /ml	0	0
Alfa-(S)	1000/ml	0	0

- 10 a = Alfa-L929-solujen hajoaminen
b = K562-solujen kasvun esto

Taulukko 6

15 NK-kasvainsolujen vastaista sytotoksisuutta edistävän aktiivisuuden molekulaarinen karakterisointi

Molekyylipaino	45,000-74,000			17,000-22,000	NK-alusta- vertailu
Isoelektrinen pH	4,5- 5,5	6,0- 6,7	7,4- 8,5	Ei fokusoitu	
Lymfotoksiini ^b	0	151	0	70	
Leukoreguliini ^c	8	1	3	0	
NK:ta hajottavia yksiköitä ^d per 10^4 solua	548 ^f	356	477 ^f	253	276
NK-edistäminen ^e	2,0	1,3	1,7	0,9	

- 25 a = Kaksi ml ihmisen lymfokiinivalmistetta erotettiin molekyylliseula-HPLC:llä fraktioiksi, joiden molekyylipaino-alueet olivat 45,000-74,000 ja 17,000-22,000. Korkeamman molekyylipainon fraktio erotettiin isoelektrisellä fokusoinnilla fraktioiksi, joiden isoelektriset pH:t olivat
- 30 4,5-5,5, 6,0-6,7 ja 7,4-8,5. Kaikki yhdistetyt fraktiot dialysoitiin PBS-PEG:tä vastaan ja steriloidtiin suodattamalla ennen koetta.
- b = Alfa-L929-solujen hajotus, yksikköä/ml.
c = K562-solujen kasvun esto, yksikköä/ml.
- 35 d = K562-soluja 1 ml:ssa suhteessa 1:5 laimennettua tut-

kittavaa fraktiota tai alustaa inkuboitiin 1 tunti ja tutkittiin sitten 4 tuntia kestäneessä ^{51}Cr -vapautuskokeessa NK-soluja käyttäen.

- e = Käsittelyryhmän hajottavien NK-yksiköiden määrän/ 10^4 solua suhde NK-alustavertailunäytteen vastaavaan arvoon.
- 5 f = Tilastollisesti merkittävästi erilainen kuin vertailunäyte ($p < 0,05$) Studentin t-testin mukaan.

Taulukko 7

Ihmisen kasvain- ja normaalisolujen suhteelliset herkkyydet leukoreguliinille
 Solu Tyyppi Solujen kasvun 50 %:isen eston aikaansaava yksikköjen määrä (a) 50%:isen sytolyysin aikaansaava yksikköiden kahdentumisaika (tuntia) Populaation
 Fraktioimaton Puhdistettu määrä (b)

Solu	Tyyppi	Solujen kasvun 50 %:isen eston aikaansaava yksikköjen määrä (a)	50%:isen sytolyysin aikaansaava yksikköiden kahdentumisaika (tuntia)	Populaation määrä (b)
Ruansulatuskanavan karsinoomat				
HT-29	paksusuoli	1,0	1,0	31
Widr	"-	1,6	1,7	40
SW-480	"-	1,2	2,2	23
SW-948	"-	2,9	c	
HUTU-80	pohjukaissuoli	6,0	2,2	20
GW-39	paksusuoli		1,5	26
IS-174	"-		13	
1463	peräsuoli	84		32
LoVo	paksusuoli	120		32
CaCo	"-	730		45
Virtsarakkokarsinoomat				
HT-1376			3,4	35
RT-4	siirtymäsolu	20		40
J-82	"-	66	390	
T-24	"-	310		33
SCABER	suumainen	ei vaikutusta		

Taulukko 7 (jatkoa)

Ihmisen kasvain- ja normaalisolujen suhteelliset herkkyydet leukoreguliinille

Solu	Tyyppi	Solujen kasvun 50 %:isen eston aikaansaava yksikköjen määrä (a)	50 %:isen sytolyysin Populaation aikaansaava yksikköiden kahdentumisaika (tuntia)
		Fraktioimaton Puhdistettu määrä (b)	

Muut syövät:

2650	Nenäkarsinoma	1,4	0,6	3	21
KB	Suun epidermoidi	8			
HeLa	Kohdunkaulan epiteelisyöpä	8			
K562	Erytroleukemia	10		d	
Hep-2	Kurkunkpää, epidermoidi	50			

Normaalisolut:

Bell	Paksusuolen limakalvosolut	Ei vaikutusta	Ei vaikutusta		
1467	Aikuisen ihon fibroblastit	"-	"-		
1505	"-	"-	"-		
1537	"-	"-	"-		

a = Määritelmän mukaan 1 yksikkö on määrä, joka saa aikaan 2×10^3 HT-29-solun 50 %:isen kasvun eston 72 tunnin viljelyn jälkeen.

b = Leukoreguliini puhdistettiin peräkkäisellä HPLC-geelisuodatuksella, sitten ionivaihtokromatografialla ja polyakryyliamidigelelektroforeesilla, jossa käytettiin lineaarista gradienttia.

c = Korkeintaan 14%:inen sytolyysi tapahtui määrällä 450 yksikköä/ml.

d = Korkeintaan 25%:inen sytolyysi tapahtui määrällä 700 yksikköä/ml.

Taulukko 8

Virtaussytometrinen analyysi monoklonaalisen vasta-aineen sitoutumisesta solun pinnan leukoreguliinireseptoriin

Monoklonaalinen vasta-aine	Positiivisia soluja (%)	
	HT-29	K562
LrR-MP28	23	2
LrR-M2	15	2

Taulukko 9

Leukoreguliinin vaikutus agarilla kasvaviin, juuri paljastettuihin ihmisen paksusuoli-
syöpäsoluihin

Potilaan nimi Pesäkeitä/syvennys (a) Prosentuaalinen esto(leukoreguliiniyksiköitä/ml)
tai numero ilman leukoreguliinia (b)
+ SE

Cohen	22 ± 6	98 (50)	68 (5)	36 (0,5)
84-2027	72 ± 4	42 (4000)	28 (400)	3 (40)
84-1991	44 ± 6	38 (4000)	0 (400)	0 (40)
845-1752	60 ± 4	25 (375)	13 (38)	0 (4)

(a) = 2×10^5 solua siirrostettiin 1 ml:n syvennyksiin.

(b) = yksi yksikkö leukoreguliinia sai aikaan 2×10^3 HT-29-solun kasvun 50 %:isen
eston 3 vrk:ssa

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä leukoreguliiniksi kutsutulla lymfokiinilla rikastetun valmisteen tuottamiseksi, jolla proteiinilla on seuraavat ominaisuudet:

(i) kyky säätää pahanlaatuisen kasvaimen fysiologia ja kasvu vaikuttamatta normaalien solujen kasvuun,

(ii) kyky suoraan hajoittaa ihmisen HT-29- ja RPMI 2650-kasvainsolut,

(iii) kykenemättömyys hajoittaa hiiren α L 929 soluja,

(iv) kyky vaimentaa ihmisen kasvainsolujen K 562 ja RPMI 2650 jakautumista,

(v) jolloin kohtien (i) - (iv) mukaiset aktiivisuudet ovat herkkiä proteiinin proteaasi- mutta ei neuraminidaasi-käsittelylle,

(vi) molekyylipaino 120 000 - 140 000 Daltonia,

(vii) isoelektrinen piste alueella 4,8 - 5,5 ja/tai alueella 7,5 - 8,3,

(viii) eluoitavissa ioninvaihtokromatografiassa välillä 0,07 ja 0,12 mol/l NaCl,

t u n n e t t u siitä, että

a) viljellään lymfokiinia tuottavia soluja,

b) lymfokiinia tuottavista soluista vapautetaan lymfokiinia sisältävä proteiinifraktio,

c) proteiinifraktion proteiinit erotetaan molekyylipainonsa ja/tai molekyylivarauksensa perusteella, ja

d) jokaisen kohdan (c) mukaisen erotusvaiheen jälkeen valitaan proteiinifraktio, jolla on mainitut ominaisuudet.

2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että kohta (c) käsittää vähintään yhden seuraavista erotustoimenpiteistä:

(aa) HPLC

(bb) ioninvaihtokromatografia

- (cc) elektroforeesi
- (dd) geelisuodatus
- (ee) isoelektrinen fokusointi.

5 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä,
t u n n e t t u siitä, että lymfokiiniä sisältävä pro-
teiinifraktio on konsentroitunut kasvualusta, joka saadaan
ihmisen perifeerisen veren yksitumaisten solujen, jotka on
käsitelty fytohemagglutiniinilla leukoreguliinin tuotannon
stimuloimiseksi, viljelmästä.

10

Patentkrav

1. Förfarande för framställning av ett preparat berikat med en lymfokin kallad leukoregulin, vilket protein har följande egenskaper:

(i) förmåga att reglera en malign tumörs fysiologi och tillväxt utan att påverka tillväxten hos normala celler;

(ii) förmåga att direkt lysa humana HT-29 och RPMI 2650 tumörceller;

(iii) oförmåga att lysa musceller α L 929;

(iv) förmåga att dämpa celldelningen hos de humana tumörcellerna K 526 och RPMI 2650;

(v) varvid aktiviteterna enligt punkterna (i)

- (iv) är känsliga för behandling av proteinet med proteinas - men inte med neuramidas;

(vi) en molekylvikt på 120 000 - 140 000 Dalton;

(vii) en isoelektrisk punkt inom området 4,8 - 5,5 och/eller inom området 7,5 - 8,3;

(viii) eluerbar med jonbytkromatografi mellan 0,07 och 0,12 mol/l NaCl;

k ä n n e t e c k n a t därav, att man

a) odlar lymfokinproducerande celler;

b) frigör den lymfokinnehållande proteinfraktionen från de lymfokinproducerande cellerna;

c) separerar proteinerna i proteinfraktionen enligt molekylstorlek och/eller molekylladdning; och

d) efter varje selektionssteg enligt punkt c) väljer ut den proteinfraktion som har nämnda egenskaper.

2. Förfarande enligt patentkravet 1, k ä n n e t e c k n a t därav, att punkt c) omfattar åtminstone ett av följande separationsåtgärder:

(aa) HPLC

(bb) jonbytkromatografi

(cc) elektrofores

(dd) gelfiltrering

(ee) isoelektrisk fokusering.

3. Förfarande enligt patentkravet 1 eller 2,
k ä n n e t e c k n a t därav, att den lymfokininnehåll-
5 lande proteinfraktionen är koncentrerat odlingsmedium från
en odling av humana perifera mononukleära blodceller som
behandlats med fytohemagglutinin för att stimulera produk-
tionen av leukoregulin.

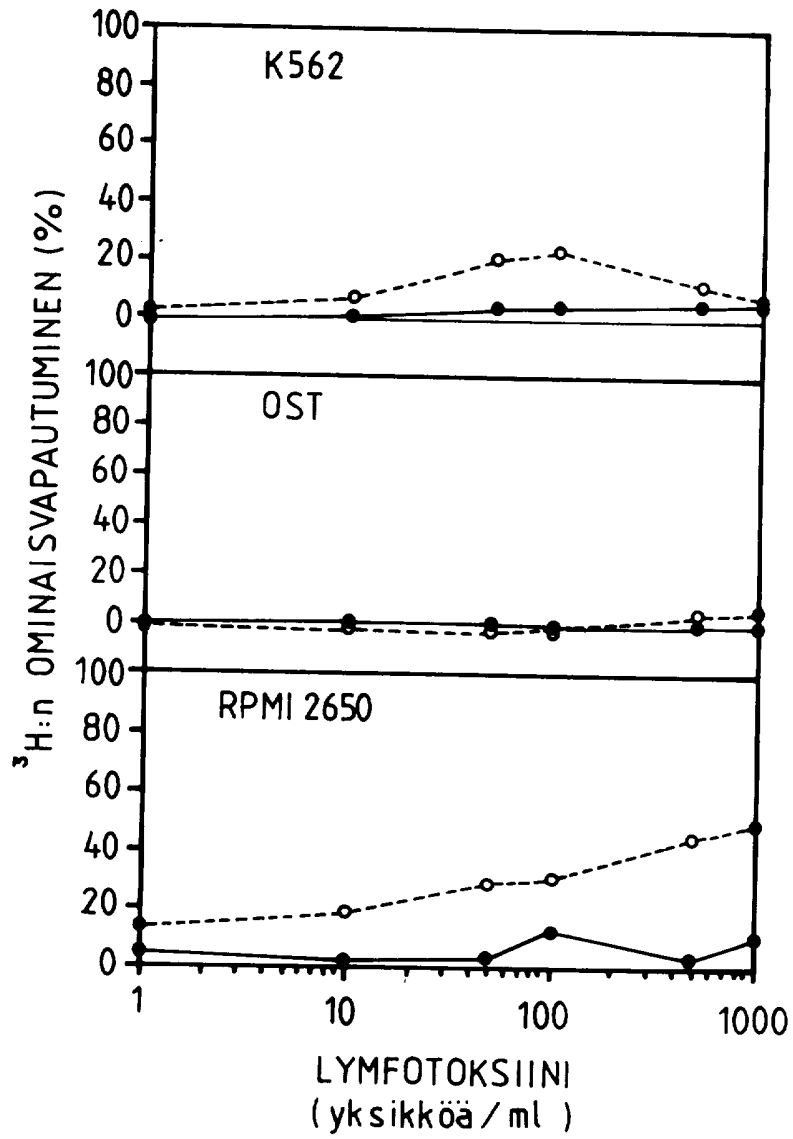


FIG. 1

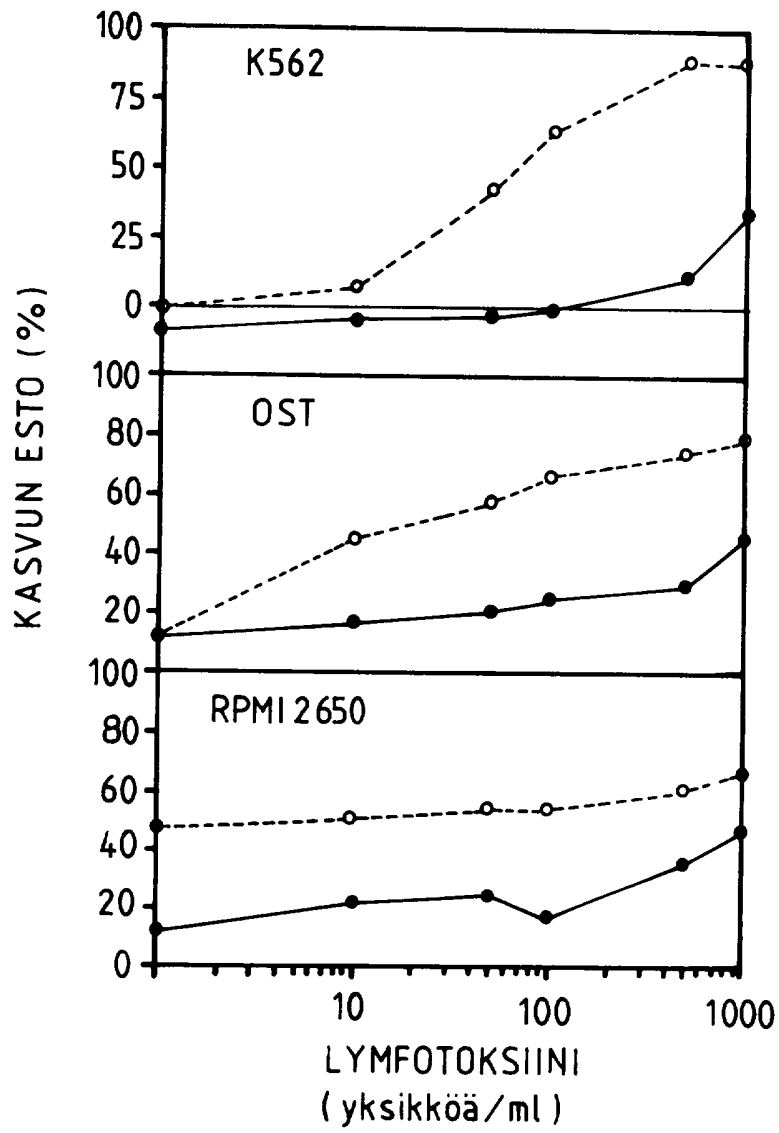


FIG. 2

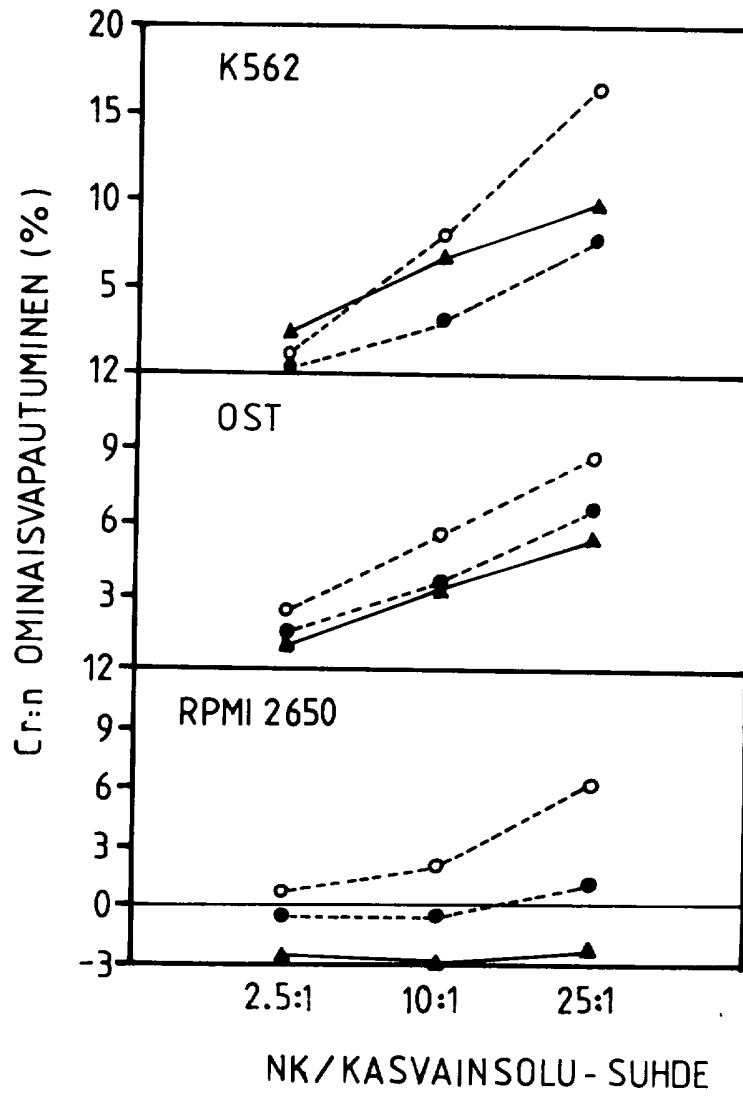


FIG. 3

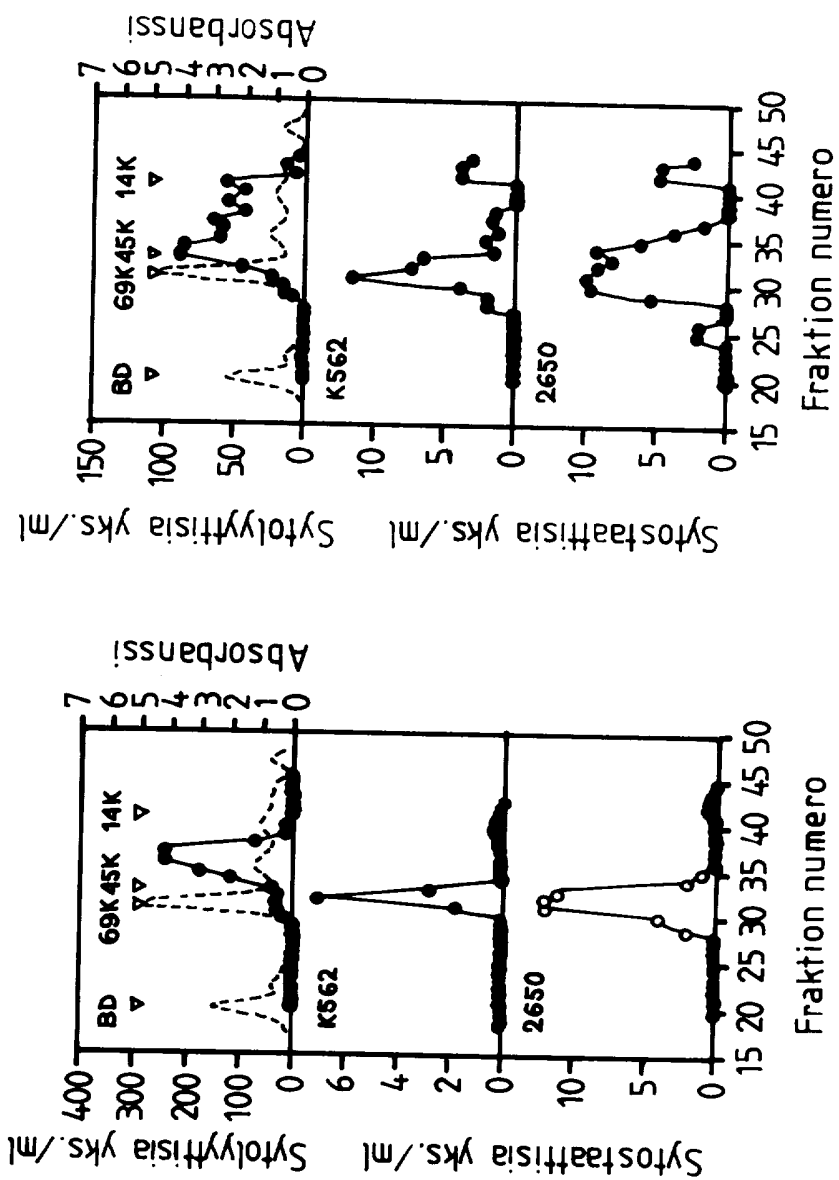


FIG.4

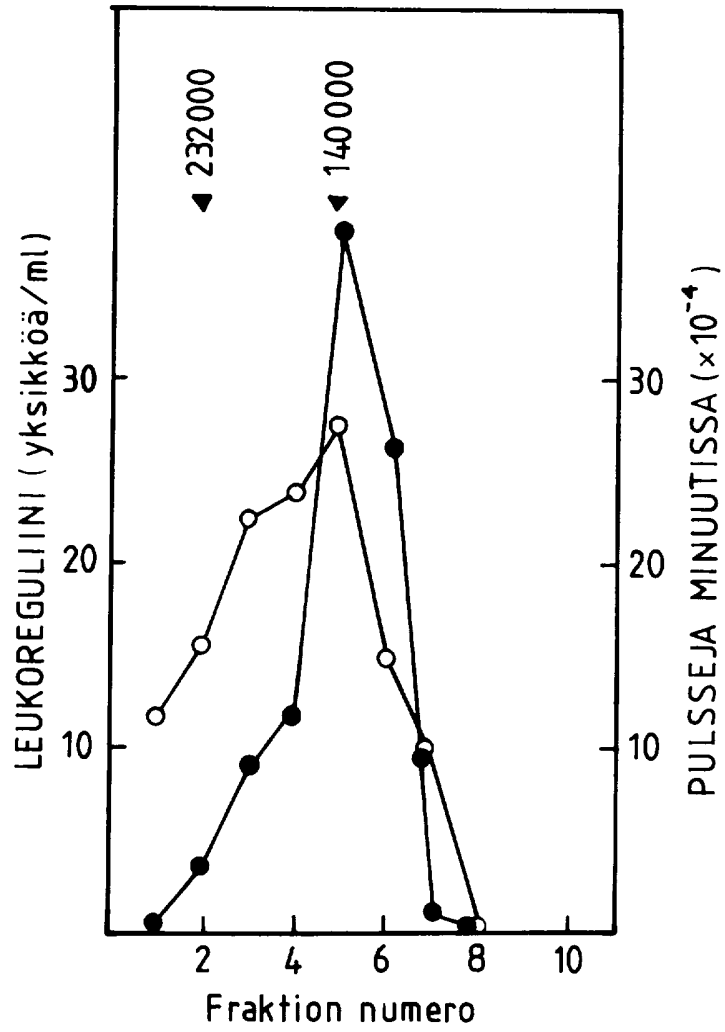


FIG. 5

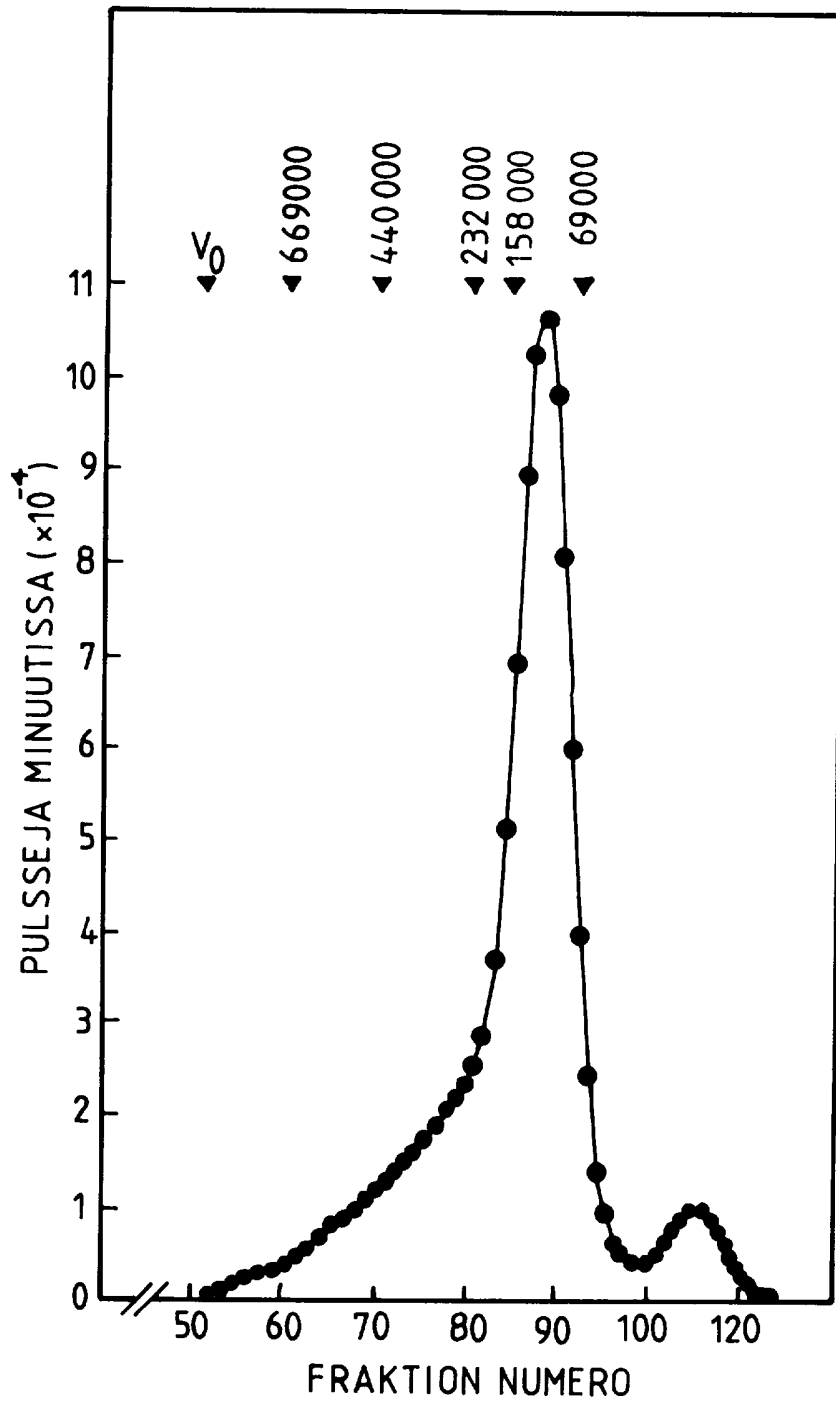


FIG. 6

85867

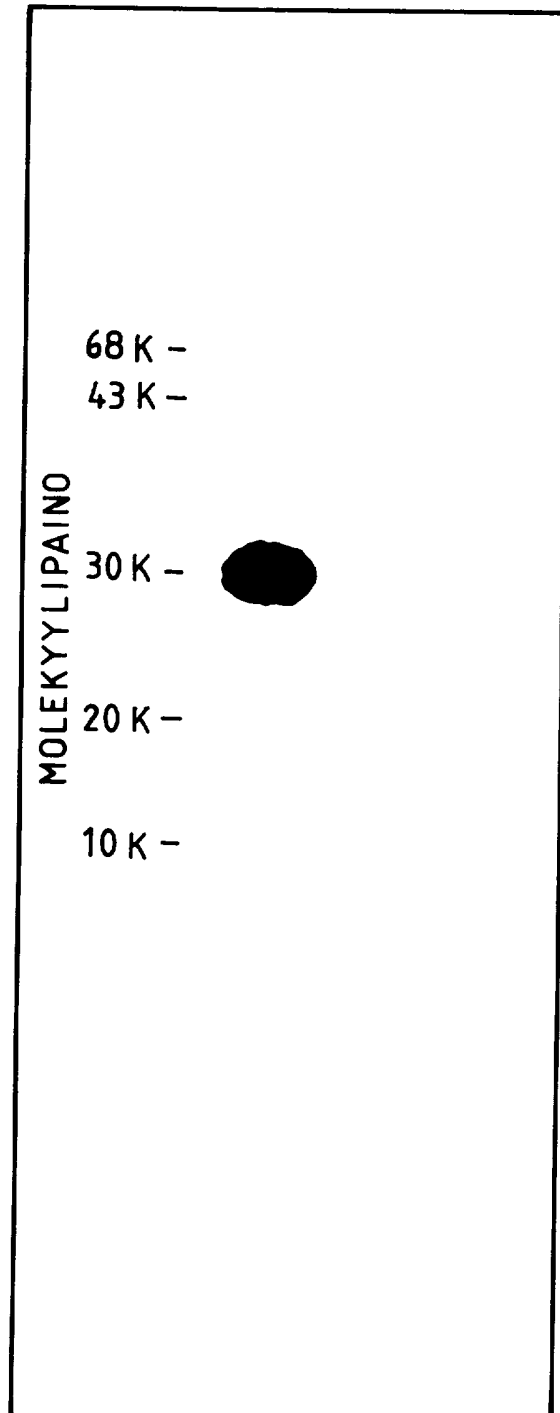


FIG. 7

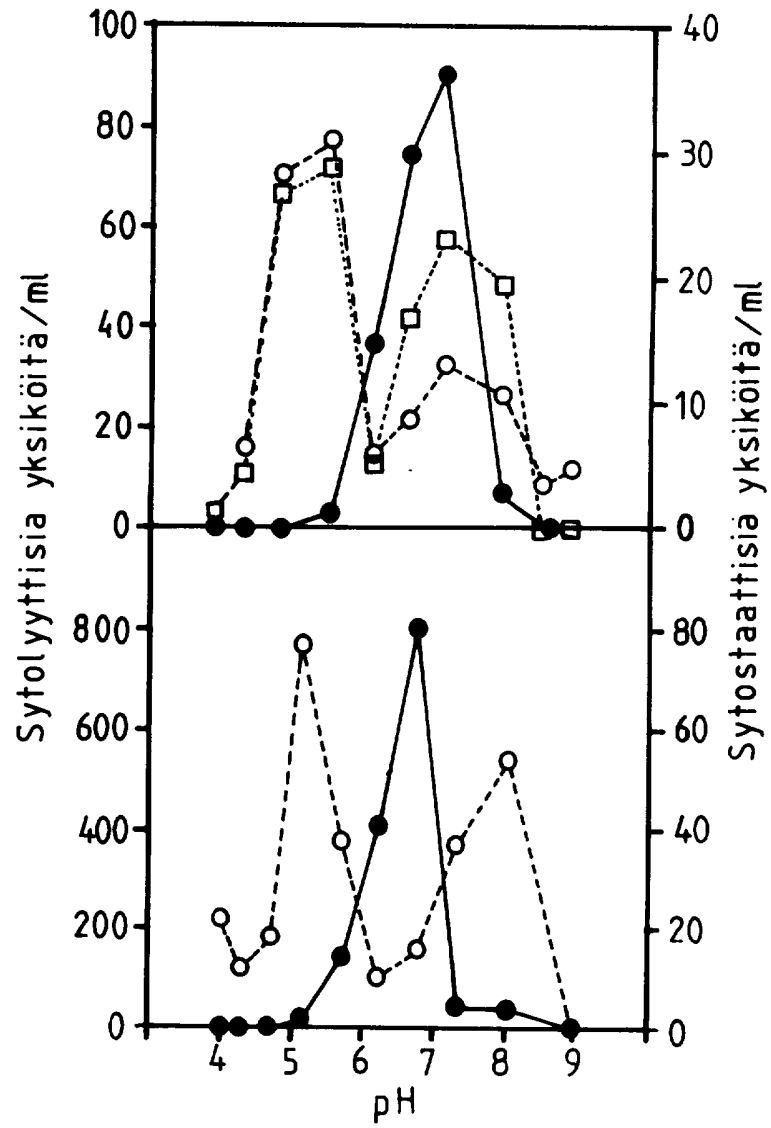


FIG. 8

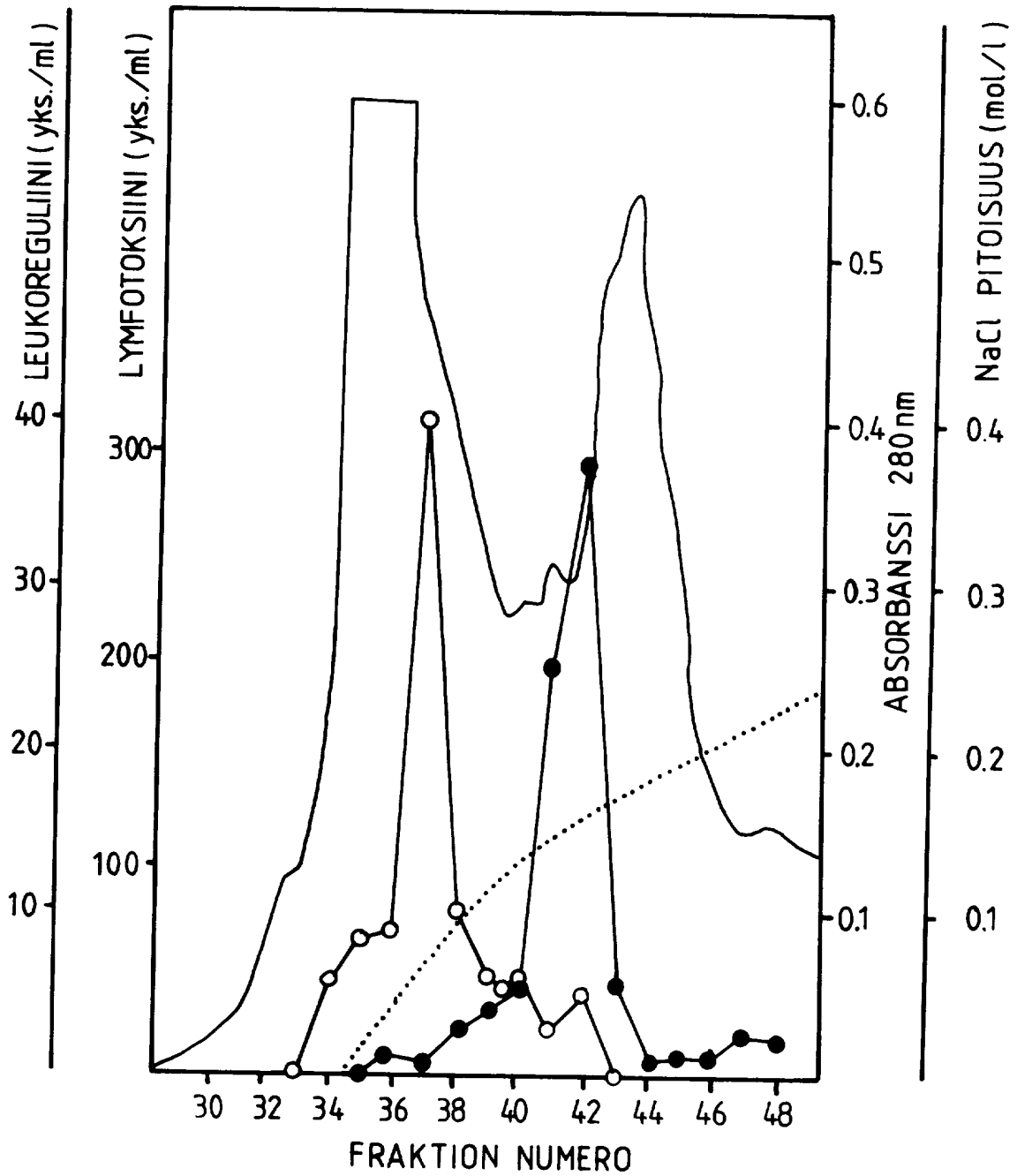


FIG. 9

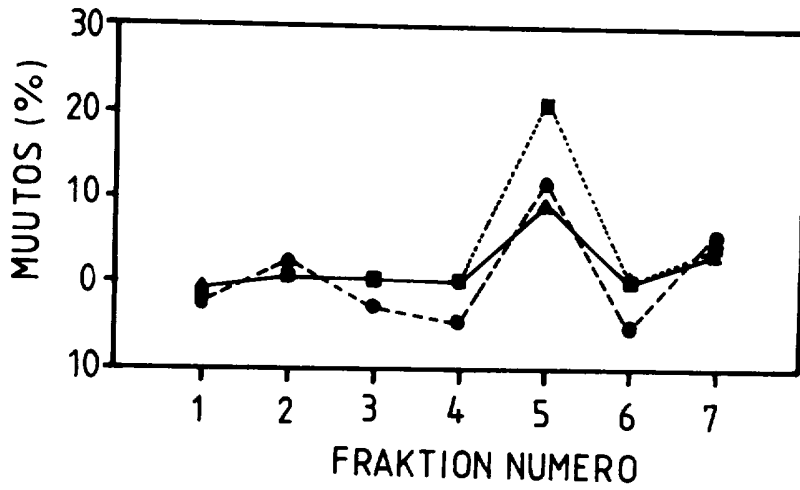
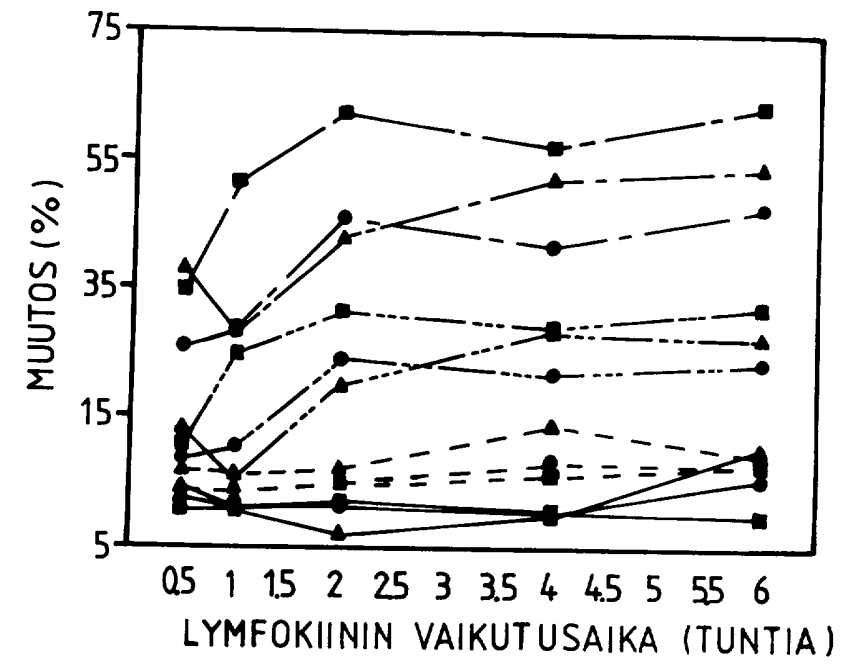


FIG. 10

LEUKOREGULIINIGEENIN KLOONAUS

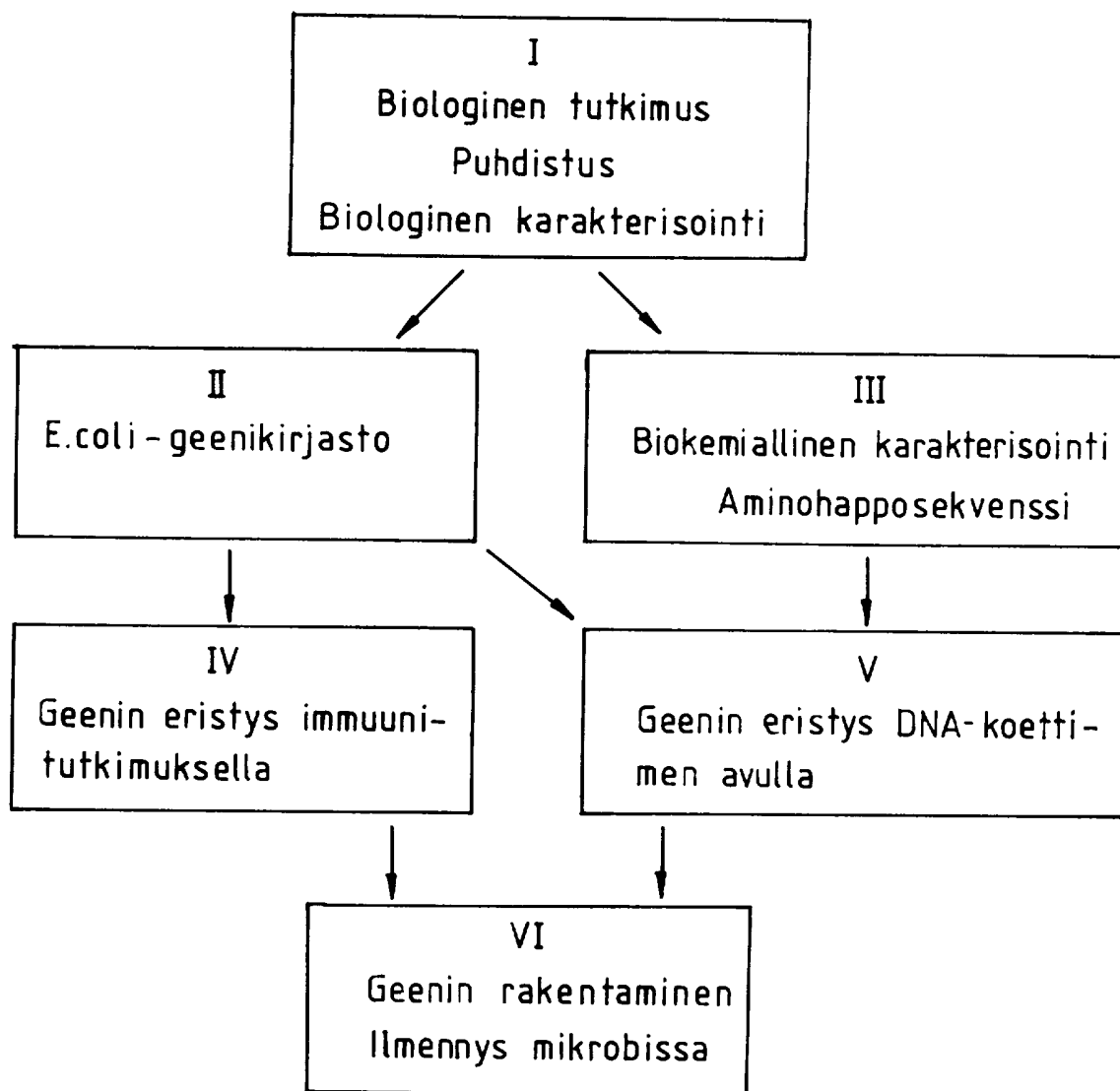


FIG. 11