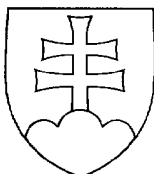


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

279 556

- (21) Číslo prihlášky: 747-93
(22) Dátum podania: 15.01.92
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 641 347
(32) Dátum priority: 16.01.91
(33) Krajina priority: US
(40) Dátum zverejnenia: 08.03.95
(45) Dátum zverejnenia udelenia vo Vestníku: 02.12.98
(86) Číslo PCT: PCT / US92/00066, 15.01.92

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶

A 61K 38/20 //
C 12N 15/24

(73) Majiteľ patentu: Schering Corporation, Kenilworth, NJ, US;

(72) Pôvodca vynálezu: Vieira Paulo J. M., Mountain View, CA, US;
Moore Kevin W., Palo Alto, CA, US;

(54) Názov vynálezu: **Liečivo na liečenie nádorov pacienta**

(57) Anotácia:

Je opísané použitie interleukínu-10 na prípravu liečiva na liečenie nádorov pacienta. Tento interleukín-10 je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z vírusového interleukínu-10 a ľudského interleukínu-10 a je súčasťou liečiva, ktoré je vo forme kontinuálnej infúzie vhodnej na podanie interleukínu-10. Množstvo interleukínu-10 v uvedenom liečive na podanie je v rozsahu 50 až 800 µg na deň.

Oblasť techniky

Vynález sa týka použitia interleukínu-10 na prípravu liečiva na liečenie nádorov pacienta, najmä liečenia neoplazmov alebo rakovín u ľudí.

Doterajší stav techniky

Imunologické prístupy k terapii rakovín sú založené na predstave, že rakovinové bunky sa nejakým spôsobom vyhýbajú obrane tela proti náhodným alebo cudzím bunkám a molekulám a že táto obrana môže byť terapeuticky stimulovaná na opätovné získanie stratenej imunity, napr. str. 623 až 648 v Kleinovej „Immunology“ (Wiley-Interscience, New York, 1962). Nedávne pozorovania, že niektoré imúnne efektoory môžu riadiť alebo nepriamo inhibovať rast nádorov, viedli k obnoveniu záujmu o tento prístup k terapii rakoviny. Napr. Herberman: Concepts Immunopathol. 1, 96 až 132 (1985) (prirodzené ničivé bunky odolávajú rastu nádorových buniek), Rosenberg a kol.: Ann. Rev. Immunol. 4, 681 až 709 (1988) (klinické použitie ničivých buniek (zabíjajúca) aktivovaných interleukínom-2 na liečenie rakoviny), Ralph a kol.: J. Exp. Med. 167, 712 až 717 (1988) (tumorová aktivita makrofágov stimulovaných lymfokíninmi), Tepper a kol.: Cell. 57, 503 až 512 (1989) (interleukín-4 má protinádorovú aktivitu), M. Cohen „Lymphokines and Tumor Immunity“, str. 237 až 253 v S. Cohen (red.) „Lymphokines and the Immune Response“ (CRC Press, Boca Raton, 1990) a pod.

Podstata vynálezu

Podstatou navrhovaného riešenia je použitie interleukínu-10 na prípravu liečiva na liečenie nádorov pacienta, kde interleukín-10 (IL-10) je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z vírusového interleukínu-10 a ľudského interleukínu-10. Liečivo je vo forme kontinuálnej infúzie vhodnej na podanie interleukínu-10, ktorého množstvo v uvedenom liečive na podanie je v rozsahu 50 až 800 µg na deň.

Interleukín-10 podľa vynálezu je výhodne vybraný zo skupiny, ktorá pozostáva z maturovaných polypeptidov s otvorenými čítacími oblasťami, ktoré sú definované sekvenciami aminokyselín uvedených v sekvencii identifikačné číslo 1 a 2 (všetky sekvencie identifikačných čísel sú uvedené bezprostredne pred bodmi patentových nárokov), v ktorých sú L-aminokyseliny označené štandardnými trojpísmenovými skratkami, pričom sa začína od N-konca. Na tieto dve formy IL-10 sa niekedy odkazuje ako na ľudský IL-10 (hIL-10 alebo inhibičný faktor syntézy ľudského cytokínu) a na vírusový ID-10 alebo BCRF1): napr. Moore a spol.: Science 248, 1230 až 1234 (1990), Vieira a spol.: Science 88, 1172 až 1176 (1991), Fiorentino a spol.: J. Exp. Med. 170, 2081 až 2095 (1985), Hsu a spol.: Science 250, 830 až 832 (1990). Výhodnejšie sa maturovaný IL-40 používaný v spôsobe podľa tohto vynálezu vyberie zo skupiny pozostávajúcej z maturovaných polypeptidov s otvorenými čítacími oblasťami, ktoré sú definované aminokyselínovými sekvenciami v sekvenciách identifikačné číslo 3 a 4 tu uvedených.

V nasledujúcej časti budú stručne opísané pripojené výkresy.

Obrázok 1 je diagram znázorňujúci cicavčí expresný vektor pcD(SRa),

Obrázok 2 je diagram znázorňujúci bakteriálny expresný vektor TPR-C11.

Obrázok 3 ukazuje plazmid pGSRG, ktorý nesie otvorenú čítaciu oblasť (DRF) myšieho IL-10, vírového IL-10 alebo ľudského IL-10 vloženého do jeho Xho reštrikčného miesta. Ukazuje tiež sekvenciu RBS-ATG-polylinkerových oblastí konečnej konštrukcie (nazvanej TAC-RBS).

Tento vynález sa týka spôsobu používania IL-10 na prevenciu alebo znižovanie postupu rakovín. Tento vynález zahŕňa tiež farmaceutické prostriedky obsahujúce IL-10 na použitie podľa tohto spôsobu. IL-10 na použitie podľa tohto vynálezu sa vyberie zo skupiny maturovaných polypeptidov kódovaných otvorenými čítacími fázami definovanými cDNA insertami pHSC, pH15C a pBCRF1(SRa), ktoré sú uložené v Americkej zbierke typov kultúr (American Type Culture Collection; ATCC), Rockville, Maryland, pod číslami 68 191, 68 192 a 68 193.

Na prípravu polypeptidov podľa tohto vynálezu sa používajú rozmanité jednobunkové a viacbunkové expresné systémy, t. j. kombinácie hostiteľ - expresný vektor. Medzi možné typy hostiteľských buniek patria, ale nie sú na ne obmedzené, bakteriálne bunky, kvasinky, hmyzie bunky, cicavčie bunky a pod. Existuje veľa prehľadných súhrnných prác, ktoré sú dobrými prievodcami systémov, napr. aby boli menované aspoň niektoré: de Boer a Shepard: „Strategies for Optimizing Gene Expression in Escherichia coli“, str. 205 až 247 v Kroon (red.) „Genes: Structure and Expression“ (John Wiley and Sons, New York, 1983), prehľadný článok niekoľko *E. Coli* expresných systémov; Kucherlapati a spol.: Critical Reviews in Biochemistry 16 - (4), 349 až 379 (1984) a Banerji a spol.: Genetic Engineering 5, 19 až 31 (1983) poskytujú prehľad spôsobov transfekcie a transformovania cicavčích buniek: Reznikoff a Goki (red.) „Maximizing Gene Expression“ (Butterworths, Boston, 1986), poskytujú prehľad vybraných spôsobov expozície génov v *E. coli*, kvasinkách a v cicavčích bunkách a Thilly „Mammalian Celi Technology“ (Butterworths, Boston, 1986) uvádzať prehľad cicavčích expresných systémov. Podobne je dostupných veľa prehľadných súhrnných článkov, ktoré opisujú techniky a podmienky na nadviazanie alebo manipuláciu špecifických cDNAs a expresiu kontrolných sekvencií pri tvorbe modifikovaných expresných vektorov vhodných na použitie podľa tohto vynálezu, napr. Sambrook a spol.

E. coli expresný systém je opísaný Riggsom v USA patente č. 4 431 739, ktorý je tu zahrnutý ako odkaz. Zvlášť užitočným prokaryotickým promotórom pre vysokú expresiu v *E. coli* je tac promotór, opísaný de Boerom v USA patente č. 4 551 433, ktorý je tu zahrnutý ako odkaz. Sú dostupné tiež sekrečné expresné vektory pre *E. coli* hostiteľa. Zvlášť užitočné sú pIN-III-ompA vektory opísané Ghayebom a spol.: EMBO J. 3, 2437 až 2442 (1984), v čom cDNA, ktorá má byť transkribovaná, je napojená na časť *E. coli* OmpA génu kódujúceho signálny peptid ompA proteínu, ktorý ďalej spôsobuje, že maturovaný proteín je sekretovaný do periplazmového priestoru baktérie. USA patenty č. 4 336 336 a 4 338 397 opisujú tiež sekrečnú expresných vektorov pre prokaryoty. Tiež tieto citácie sú tu zahrnuté ako odkazy.

Vhodnými hostiteľmi pre prokaryotické expresné vektory sú početné kmene baktérií vrátane kmeňov *E. coli*, ako je napríklad W3110 (ATCC č. 27 325), JA221, C600, ED767, DH1, LE392, HB101, X1776, (ATCC č. 31 244), X2282, RR1 (ATCC č. 31 343), MRC1, kmene *Bacillus subtilis* a iné enterobaktérie, ako je napríklad *Salmonella typhimurium* alebo *Serratia marcescens* a rôzne druhy *Pseudomonas*. Všeobecné spôsoby odvodenia bakteriálnych kmeňov, ako je *E. coli* K12 xL776, použiteľných na expresiu eukaryotických proteínov, sú opísané Curtisom III

v USA patente č. 4 190 495. Tento patent je tu tiež zahrnutý ako odkaz.

Pri prokaryotických a eukaryotických mikroorganizmoch sa na prípravu proteínov podľa tohto vynálezu používajú tiež expresné systémy obsahujúce bunky odvodené od viacbunkových organizmov. Zvlášť zaujímavé sú cicavčie expresné systémy, pretože ich postranlačné opracovanie pravdepodobne produkuje biologicky aktívne cicavčie proteíny. Ako vektory pre cicavčích hostiteľov bolo použitých niekoľko DNA nádorových vírusov. Zvlášť dôležité sú početné vektory, ktoré obsahujú SV40 replikačné, transkripčné alebo translačné kontrolné sekvencie kondenzované s bakteriálnymi replikačnými kontrolnými sekvenciami, napr. pod vektory vyvinuté Okayamou a Bergen, ktoré sú opísané v *Mol. Cell. Biol.* 2, 161 až 170 (1982) a *Mol. Cell. Biol.* 3, 280 až 289 (1983) a zlepšené Takefou a spol.: *Mol. Cell. Biol.* 8, 466 až 472 (1988). Tiež tieto citáty sú tu zahrnuté ako odkaz. Medzi ďalšie na SV40 založené cicavčie expresné vektory patria tie, ktoré boli opísané Kaufmanom a Sharpom v *Mol. Cell. Biol.* 2, 1304 až 1319 (1982) a Clarkom a spol. v USA patente č. 4 675 285, obe tieto citácie sú tu zahrnuté ako odkazy. Výhodnými hostiteľmi uvedených vektorov obsahujúce sekvenciu SV40 počiatku replikácie a neporušený A gén sa môžu replikovať autonómne v opičích bunkách (aby sa získali vysoké počty kópií alebo stabilnejší počet kópií než u neautonómne replikujúcich plazmidov). Navyše vektory obsahujúce sekvencie SV40 počiatku replikácie bez neporušeného A génu sa môžu replikovať autonómne v opičích bunkách COS7 vo vysokom počte kópií (ale nestabilne), ako je to opísané Gluzmanom: *Cell.* 23, 175 až 182 (1981). Tieto bunky sú dostupné od ATCC (pod číslom CRL 1651). Uvedené vektory založené na SV40 sú schopné transformovať tiež iné cicavčie bunky, ako sú napríklad myšie L bunky, integráciou do DNA hosťiteľskej bunky.

Na prípravu polypeptidov podľa vynálezu sa môžu používať tiež viacbunkové organizmy, napríklad hmyzích lariev, Maeda a spol.: *Nature* 315, 592 až 594 (1985) a *Ann. Rev. Entomol.* 351 až 372 (1989), a transgených živočíchov, Jaenisch: *Science* 240, 1468 až 1474 (1988).

I. Testovanie interleukína-10: IL-10 vykazujú niektoré biologické účinky, ktoré by mohli byť základom pre testy a jednotky. IL-10 majú vlastnosť inhibovať syntézu aspoň jedného cytokínu v skupine pozostávajúcej z IFN- γ , lymfotoxínu, IL-2, IL-3 a GM-CSF v populácii T pomocných buniek indukovaných tak, aby syntetizovali jeden alebo viac týchto cytokínov vystavením pôsobeniu buniek so syngenným antigénom (APCs) a antigénu. Pri tejto aktivite sa APCs nechajú spracovať tak, že nie sú schopné replikovať, ale ich antigén-opracovávajúci systém zostáva funkčný. To sa vhodne dosiahne ožiarení APCs, napr. asi 1500 až 3000 R (žiarenia alebo X) pred tým, než sa zmiešajú s T bunkami.

Inhibícia cytokínu sa môže testovať tiež primárnou alebo výhodnejšie sekundárnou MLR (mixed-lymphocyte reaction; reakcia zmiešaných lymfocytov). V tomto prípade nie je potrebné používať syngénne APCs. MLR sú dobre známe odborníkom, napr. Bradley, str. 162 až 166 v Mishell a spol. (red.): „Selected Methods in Cellular Immunology“ (Freeman, San Francisco, 1980) a Battisto a spol.: *Meth. in Enzymol.* 150, 83 až 91 (1987). V stručnosti - zmiešajú sa dve populácie allogénnych lymfoidných buniek, jedna populácia sa pred zmiešaním spracuje tak, aby sa zabránilo proliferácii, napr. ožiarení. Populácia buniek sa výhodne pripraví v koncentrácii asi $2 \cdot 10^6$ buniek na ml v doplnenom médiu, napr. RPMI 1640 s 10 % plodového telacieho séra. Na test tak kontrolovaných, ako aj testovaných kultúr sa zmieša 0,5 ml každej populácie. Pri sekundárnej MLR sa bunky, ktoré ostávajú po siedmich dňoch v primárnej MLR, restimulujú čerstvo pripravenými ožiarenými stimulačnými bunkami. Vzorka, o ktorej sa predpokladá, že obsahuje IL-10, sa môže pridať k testovaným kultúram v čase zmiešania a tak kontroly, ako aj testovania kultúry sa testujú na produkcii cytokínu 1 až 3 dni po zmiešaní.

Testy na IL-10 sa získanými populáciami buniek T alebo APC populáciami používajú spôsoby, ktoré sú dobre známe odborníkom a ktoré sú opísané DiSabatom a spol. (red.): *Meth. in Enzymol.* 108 (1984). APCs pre výhodný IL-10 sú peridérne krvné monocyty. Tieto monocyty sa získavajú štandardnými spôsobmi, napr. spôsobom opísaným Boyumom: *Meth. in Enzymol.* 108, 88 až 102 (1984), Mage: *Meth. in Enzymol.* 108, 118 až 132 (1984), Litvin a spol.: *Meth. in Enzymol.* 108, 298 až 302 (1984), Stevenson: *Meth. in Enzymol.* 108, 242 až 249 (1989) a Romain a spol.: *Meth. in Enzymol.* 108, 148 až 153 (1984), ktoré sú tu zahrnuté ako odkazy. V IL-10 testoch sa výhodne používajú pomocné T bunky, ktoré sa získavajú najskôr oddelením lymfocytov z periférnej krvi a potom vybraním, napr. „panning“ alebo prietokovou cytometriou pomocných buniek pomocou komerčne dostupných anti-CD4 protilátok, napr. OKT4 opísaných v USA patente č. 4 381 295 a dostupných od Ortho Pharmaceutical Corp. Potrebné spôsoby sú opísané Boyumom v *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21, (Suppl. 97), 77 (1968), v *Meth. in Enzymol.* 108 (uvedená citácia) a Bramom a spol.: *Meth. in Enzymol.* 121, 737 až 747 (1986). Obvykle sa PBLs získavajú z čerstvej krvi odstreďovaním Ficoll Hypaque hustotným gradientom.

V teste sa môžu používať rozličné antigény, napr. KLH (Keyhole limpet hemocyanin), hydínový γ -globulín alebo podobné. Výhodnejšie, miesto antigénu, sú pomocné T bunky v teste stimulované anti-CD3 monoklonálnou protilátkou, napr. OKT3 opísanou v USA patente č. 4 361 549.

Koncentrácia cytokínu v kontrolných a testovaných vzorkách sa meria štandardnými biologickými alebo imunochemickými testami. Konštrukcie imunochemických testov pre špecifické cytokíny sú dobre známe odborníkom, ak je dostupný vyčistený cytokín, napr. Campbell „Monoclonal Antibody Technology“ (Elsevier, Amsterdam, 1984), Tijssen: „Practise and Theory of Enzyme Immunoassays“ (Elsevier, Amsterdam, 1985) a USA patent číslo 4 486 530 sú príklady rozsiahlej literatúry o tomto predmete. Komerčne dostupné od Goenzyme Corp. (Boston, Ma.) sú ELISA zostavy pre ľudský IL-2, ľudský IL-3 a ľudský GM-CSF a ELISA zostava pre ľudský IFN- γ komerčne dostupný od Endogen, Inc. (Boston, Ma.). Polyklonálne protilátky špecifické pre ľudský lymfotoxín, ktoré sú dostupné od Goenzyme Corp., sa môžu používať v radioimunoanalýze ľudského lymfotoxínu, napr. Chard: „An Introduction To Radioimmunoassay and related Techniques“ (Elsevier, Amsterdam, 1982).

Na stanovenie IL-10 aktivity sa môžu použiť tiež uvedené biologické analýzy cytokínov. Biologická analýza ľudského lymfotoxínu je opísaná Aggarwalom: *Meth. in Enzymol.* 116, 441 až 447 (1985) a Matthewsom a spol.: str. 221 až 225 Clemensom a spol. (red.): „Lymphokines and Interferons: A Practical Approach“ (IRL Press, Washington, D. C., 1987). Ľudský IL-2 a GM-CSF sa môžu analyzovať na faktore závislými bunkovými líniami C1LL-2 a KG-1, ktoré sú dostupné od ATCC pod číslami TIB 214 a CCL 246. Ľudský IL-3 sa môže analyzovať svojou schopnosťou stimulovať tvorbu rozličných hematopoietických kolónií v kultúrach mäkkého agaru, napr. ako opísal Metcalf: „The Hemopoietic Colony Stimulating Factors“ (Else-

vier, Amsterdam, 1984). INF- sa dá kvantifikovať antivírusovými analýzami, napr. Maeger, str. 129 až 147 v Clemenson a spol. (red.) (uvedená citácia).

Produkcija cytokinu sa môže zisťovať mRNA analýzou. Cytokinová mRNA sa môžu merať cytoplazmovou bodkovačou hybridizáciou, ako opisali White a spol.: J. Biol. Chem. 257, 8569 až 8572 (1982) a Gillespie a spol.: USA patent č. 4 483 920. Tiež tieto citácie sú tu zahrnuté ako odkazy. Medzi ďalšie možné prístupy patrí blotovanie bodkovaním s využitím vyčistenej RNA, napr. kapitola 6 v Hames a spol. (red.): „Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach“ (IRL Press, Washington, D. C. 1985).

V niektorých prípadoch sa vzorky, ktoré sa majú testovať na IL-10 aktivitu, musia najprv spracovať tak, aby sa odstránili cytokiny, ktoré môžu interferovať s testom. Napríklad IL-2 zvyšuje produkciu IFN- v niektorých bunkách. Podľa toho, aké pomocné T bunky sa v teste používajú, sa IL-2 odstraňuje zo vzorky, ktorá je testovaná. Takéto odstránenie sa vhodne uskutočňuje tak, že sa vzorka nechá prejsť štandardnou kolónou s anti-cytokinovou aktivitou.

Z dôvodov vhodnosti sa jednotky IL-10 aktivity definujú v pojmoch schopnosti IL-10 zväčšiť proliferáciu MC/9 buniek indukovanou IL-4, ktoré sú opísané v USA patente č. 4 559 310 a ktoré sú dostupné od ATCC pod číslom CRL 8306. 1 jednotka/ml je definovaná ako taká koncentrácia IL-10, ktorá poskytuje 50 % maxima stimulácie MC/9 proliferácie nad hladinu IL-4 v nasledujúcom teste: Pripraví sa dvojaké alebo trojaké zriedenie IL-4 a IL-10 v 50 µl média na jamku na štandardnú mikrotitrovací dosku; médiom obsahuje RPMI 1640, 10 % plodového tefacieho séra, 50 µM 2-merkaptotanolu, 2mM glutamínu, penicilínu (100 jednotiek na liter) a streptomycín (100 µg/l). Pridá sa IL-4, 25 µl/jamku, 1600 jednotiek/ml (konečných 400 jednotiek/ml) zriedených médiom a inkubuje sa cez noc, napr. 20 až 24 hodín. Pridá sa ³H-tymidin (napr. 50 mikroCi/ml v médiu) pri hodnote 0,5 až 1,0 µCi/jamku a opäť sa bunky inkubujú cez noc, potom sa bunky izolujú a odmeria sa obsiahnutá rádioaktivita.

II. Čistenie a farmaceutické prostriedky: Ak k expresii polypeptidov podľa tohto vynálezu dochádza v rozpustnej forme, napríklad ako sekretovaný produkt transformovaných kvasiniek alebo cicavčích buniek, môžu sa tieto polypeptidy vyčistiť štandardnými spôsobmi známymi odborníkom, vrátane stupňov zrážania síranom amónnym, ionexovej chromatografie, gélovej filtrácie, elektroforézy, afinitnej chromatografie alebo podobných, napr. „Enzyme Purification and Related Techniques“, Method in Enzymology 22, 233 až 577 (1977) a Schopes R.: „Protein Purification; Principles and Practice“ (Springer-Verlag, New York, 1982) poskytujú návody na tieto čistenia. Podobne ak sa polypeptidy podľa tohto vynálezu získavajú expresiou v nerozpustnej forme, napríklad ako agregáty, inkluzné telesá alebo podobne, môžu sa vyčistiť štandardnými postupmi známymi odborníkom, medzi ktoré patrí oddelenie inkluzných teliesok z rozbitých buniek odstredovaním, solubilizáciou inkluzných telies chaotropnými činidlami a redukujúcimi činidlami, zriedením solubilizovanej zmesi a znížením koncentrácie chaotropného činidla a redukujúceho činidla tak, že polypeptid zaujme biologicky aktívnu konformáciu. Posledné postupy sú uvedené v nasledujúcich citáciách, ktoré sú tu zahrnuté ako odkazy: Winkler a spol.: Biochemistry 25 m, 4041 až 40405 (1986), Winkler a spol.: Biotechnology 3, 992 až 998 (1985), Koths a spol.: USA patent č. 4 569 790 a Európske patentové prihlášky číslo 86306917,5 a 86306353,3.

Pojem „efektívne množstvo“ tak, ako je tu používaný, znamená množstvo postačujúce na zníženie alebo zabrán-

nie rastu nádoru. Efektívne množstvo pre príslušného pacienta sa môže meniť podľa závislosti od takých faktorov, ako sú stav a typ nádorového ochorenia, ktoré sa má liečiť, celkový zdravotný stav pacienta, spôsob podávania, prudkosť vedľajších účinkov a pod. Obvykle sa IL-10 podáva ako farmaceutický prostriedok obsahujúci efektívne množstvo IL-10 a farmaceutický nosič. Farmaceutický nosič môže znamenať akúkoľvek zlučiteľnú, netoxickú látku, ktorá je vhodná na dodávanie prostriedkov podľa tohto vynálezu pacientovi. Všeobecne sú prostriedky užitočné parenterálne podávanie takých liečiv dobre známe, napr. „Remington's Pharmaceutical Science“, 15. vydanie (Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1980). Prostriedky podľa tohto vynálezu sa môžu do tela pacienta zavádzať tiež implantovateľným alebo injektovateľným systémom pre dodávanie liečiva: napr. Urquhart a spol.: Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24, 199 až 236 (1984), Lewis a spol.: Noctrolled Release of Pesticides and Pharmaceuticals“ (Plenum Press, New York, 1981), USA patent č. 3 773 919, USA patent č. 3 270 960 a podobné.

Ak sa podáva parenterálne, potom sa IL-10 pripraví (formuje) ako jednotková dávková injektovateľná forma (roztok, suspenzia, emulzia) spoločne s farmaceutickým nosičom. Medzi príklady takých nosičov patrí normálny solný roztok, Ringerov roztok, roztok dextrosy a Hankov roztok. Môžu sa používať tiež nevodné nosiče, ako sú napríklad netuhnúce oleje a etyl-oleat. Výhodným nosičom je 5 % roztok dextrózy v solnom roztoku (roztoku chloridu sodného vo vode). Nosič môže obsahovať menšie množstvo prísad, ako sú napríklad látky, ktoré zvyšujú izotonickosť roztoku a chemickú stabilitu, napríklad tlmivé roztoky a ochranné činidlá. IL-10 sa výhodne pripravuje vo forme prostriedku vo vyčistenej forme, ktorá v podstate neobsahuje agregáty a ďalšie proteíny v koncentrácii od asi 5 do asi 20 µg/ml. IL-10 sa výhodne podáva kontinuálnou infúziou tak, že jeho množstvo sa pohybuje v rozsahu asi 50 až 800 µg podávaných denne (t. j. asi 1 až 16 µg/kg/deň). Denná infúzna rýchlosť sa môže meniť podľa sledovania vedľajších účinkov a podľa počtu červených krviniek.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Nasledujúce príklady slúžia na ilustráciu tohto vynálezu. Zvolené vektory a zvolení hostitelia, koncentrácia reakčných činidiel, teploty a hodnoty ďalších premenných sú iba príklady aplikácie podľa tohto vynálezu a nie sú považované ako obmedzenie tohto vynálezu.

Príklad 1

Expresia ľudského CSIF v bakteriálnom hostiteľovi

Z radu chemických syntetizovaných fragmentov dvojitých vláknovej DNA sa zostaví syntetický ľudský CSIF gén. Vytvorí sa tak expresný vektor označený TAC-RBS-hCSIF. Klonovanie a expresia sa uskutočňuje v štandardnom bakteriálnom systéme, napríklad *E. coli* K-12 kmeňa JM101, JM103 alebo podobných, opísaných Viou a Messingom: Gene 19, 259 až 268 (1982). Štiepenie reštrikčnými endonukleázami a reakcia s ligázami sa uskutočňuje podľa štandardných postupov, napríklad Maniatis a spol.: „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“ (Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1982).

Alkalický spôsob (Maniatis a spol., uvedená citácia) sa používa na prípravu plazmidov malom meradle. Na prípravu vo veľkom meradle sa používa modifikácia alkalického spôsobu, podľa ktorého sa Na vyzrážanie nukleových ky-

selin v vyčereného lyzátu použije rovnaký objem izopropanolu. Vyzrážanie studeným 2,5 M octanom amónnym sa používa na odstránenie RNA pred odstredovaním rovnovážnou hustotou chloridu cézneho a detekciou etidiumbromidom.

Pri hybridizácii na filtre sa na prenesenie kolónie, ktoré sa potom lisujú reakciou (vždy počas dvoch minút) s 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl a potom s 1M Tris.HCl, pH 8,0, 1,5 M NaCl a nasledujúcim zahriatím na 80 °C (30 minút), používajú kolieska filtra Whatman 540. Hybridizácia sa uskutočňuje v 6 x SSPE, 20 % formamidu, 0,1 % dodecylsulfátu sodnom (SDS), 100 mg/l *E. coli* tRNA, 100 mg/ml farbiva Codmassie Brilliant Blue G-250 Bio-Rad pri 42 °C počas 6 hodín s použitím ³²p- značených (kinazovaných) syntetických DNAs (20 x SSPE sa pripraví rozpustením 174 g NaCl, 27,6 g NaH₂PO₄·9H₂O a 7,4 g etyléndiaminotetraoctovej kyseliny v 800 ml vody, pH sa upraví hydroxidom sodným na 7,4, objem sa upraví na 1 liter a vzorka sa sterilizuje v autokláve). Filtre sa premyjú dvakrát (15 minút, teplota miestnosti) i x SSPE, 0,1 % SDS. Po autorádiografii (Fuji RX film) sa pozitívne kolónie umiestnia na filtre zoradením vyrastených kolónií modro zafarbených. DNA sa sekvencuje dideoxymetódou. Sanger a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463 (1977). Templáty pre dideoxyreakciu sú buď jednovláknové DNA príslušných oblastí reklonované do vektorov M13mp (napr. Messing a spol.: Nucleic Acids Res. 9, 309 (1981), alebo dvojvláknové DNA pripravené minialkalickým spôsobom a denaturovaná 0,2 M hydroxidom sodným (5 minút, teplota miestnosti) a vyzrážaná s 0,2 M hydroxidom sodného a 1,43 M octanu amónneho pridaním dvoch objemov etanolu. DNA sa môže syntetizovať fosforamiditovou chémiou syntetizátorom Applied Biosystems 380A Synthesizer; syntéza, odstránenie chrániacich skupín, štiepenie a vyčistenie (7M močovinná PAGE, elúcia, chromatografia na DEAE-celulóze) sa prevádza tak, ako je opísané v príručke pre syntetizátor 380A.

Doplňkové vlákna syntetických DNA, ktoré sa majú klonovať (každé 400 ng), sa zmiešajú a fosforylujú polynukleotidkinázou v reakcii s objemom 50 ml. Táto DNA sa liguje v objeme 50 ml za teploty miestnosti 4 až 12 hodín s 1 mg vektorovej DNA rozštiepenej príslušným reštrikčným enzýmom. Podmienky pre fosforyláciu, štiepenie reštrikčnými enzýmami, polymerázové reakcie a ligácia sú opísané v literatúre (Maniatis a spol.: uvedená citácia). Spočítajú sa kolónie na lacZ+ (ak je to žiadané) vysiatiť na L agar doplnený o ampicilín, izopropyl-1-toibeta-D-galaktózid (IPTG) (0,4 mM) a 5-bróm-4-chlór-3-indoty-1-beta-D-galaktopyranosid (x-gal) (40 mg/ml).

Vektor TAC-RBS sa skonštruuje doplnením DNA polymerázou jediného BamHI miesta tacP-nesúceho plazmidu pDR540 (Pharmacia). Ten sa potom liguje s nefosforylovanými oligonukleotidmi (Pharmacia), ktoré tvoria dvojvláknový fragment kódujúci súhlasné ribozómové väzobné miesto, ako je to uvedené v sekvencii identifikačné číslo 5 a označí sa RBS. Po ligácii sa zmes fosforyluje a religuje so SstI linkerom ATGAGCTCAT. Tento komplex sa potom rozštiepi pôsobením SstI a EcoRI. Elektroforézou na polyakrylamidovom géle (PAGE) sa izoluje fragment pri 173 pároch nukleotidov (pn). Tento fragment sa klonuje do pUC19 (Pharmacia) rozštiepeného pôsobením EcoRI a SstI (ako opísané). Sekvencia RBS-ATG-polylinkerových oblastí konečnej konštrukcie (nazývaná TAC-RBS) je uvedená na obrázku 3.

Tento syntetický IL-10 gén sa vstaviť do plazmidu pUC19 v ôsmich stupňoch. V každom stupni inzerty bez delícií alebo inzercii môžu detegovať po klonovaní zacho-

vaním lacZ(a) génu pUC19 v oblasti s ATG štart kodónom vloženým v stupni 1. Klony, ktoré obsahujú delečné alebo inzerčné zmeny, sa môžu odfiltrovať vyhodnotením modrých kolónií na L-ampicilínových doskách, obsahujúcich x-gél a IPTG. V každom stupni sa sekvencia inzertov môže ľahko potvrdiť použitím univerzálneho sekvenčného primeru pri prípravách plazmidového DNA v malom meradle, napr. dostupných od Boehringer Mannheim.

V stupni 1 sa vektor TAC-RBS rozštiepi pôsobením SstI, nechá sa zreagovať s T4 DNA polymerázou (ktorej 3-exonukleázová aktivita štiepi 3-prečnievajúce vlákna SstI štepov za vzniku fragmentov so zarovnanými koncami) a po deaktivácii T4 DNA polymerázy, sa nechá zreagovať s EcoRI. Vznikne tak fragment pri 173 pároch nukleotidov obsahujúci TAC-RBS oblasť, ktorý má zarovnaný koniec na ATG štart kodónu a EcoRI rozštiepenia na opačnom konci. Nakoniec sa izoluje fragment TAC-RBS pri 173 pároch nukleotidov.

V stupni 2 sa izolovaný TAC-RBS fragment zo stupňa 1 zmieša s plazmidom pUC19 rozštiepeným pôsobením EcoRI a KpnI a syntetický fragment 1A/B uvedený v nižšie uvedenej sekvencii identifikačné číslo 6 má zarovnané konce na konci proti smeru vlákna a posunuté konce zodpovedajúce štepku KpnI na svojom konci v smere vlákna. Tento KpnI koniec je priľahlý k miestu BstEII a v smere vlákna miesta BstEII. Tieto fragmenty sa ligujú. Vytvorí sa pUC19 stupňa 2.

V stupni 3 sa syntetický fragment 2A/B uvedený v sekvencii identifikačné číslo 7 a 3A/B uvedený v sekvencii identifikačné číslo B zmieša s plazmidom pUC19 zo stupňa 2 rozštiepeným pôsobením BstEII a SmaI (po amplifikácii a vyčistení) a liguje sa za vzniku plazmidu pUC19 stupňa 3. Povedzte si, že koniec v smere vlákna fragmentu 3A/B obsahuje ďalšie nukleotidy, ktoré tvoria SmaI zarovnaný koniec. Tieto ďalšie nukleotidy sú štiepené v stupni 4. Tiež fragmenty 2A/B a 3A/B majú doplnkové jednovláknové konce pri 9 zvyškoch, ktoré sa anelujú po zmiešaní a zanechávajú tak BstEII štep 2A/B proti smeru vlákna a zarovnaný koniec 3A/B v smere vlákna pre ligovanie na pUC19.

V stupni 4 sa pUC19 zo stupňa 3 rozštiepi pôsobením AflIII a XbaI, amplifikuje, vyčistí, znovu vyčistí, zmieša sa syntetickým fragmentom 4A/B uvedeným v sekvencii identifikačného čísla 9 a liguje za vzniku pUC19 zo stupňa 4.

V stupni 5 sa pUC19 zo stupňa 4 rozštiepi pôsobením XbaI a SalI, amplifikuje a vyčistí, zmieša sa so syntetickým fragmentom 5A/B uvedeným v sekvencii identifikačného čísla 10 a liguje sa za vzniku pUC190 zo stupňa 5. Všimnite si, že SalI posunutý koniec fragmentu 5A/B sa odstráni štiepením pôsobením HpaI v stupni 6.

V stupni 6 sa pUC19 zo stupňa 5 rozštiepi pôsobením HpaI a PstI, amplifikuje, vyčistí, zmieša so syntetickým fragmentom 6A/B uvedeným v sekvencii identifikačného čísla 11 a liguje sa za vzniku pUC19 zo stupňa 6.

V stupni 7 sa pUC19 zo stupňa 6 rozštiepi pôsobením ClaI a SphI, amplifikuje, vyčistí, zmieša so syntetickým fragmentom 7A/B uvedeným v sekvencii identifikačného čísla 12 a liguje sa za vzniku pUC19 zo stupňa 7.

V stupni 8 sa pUC19 zo stupňa 7 rozštiepi pôsobením MluI a HindIII, amplifikuje, vyčistí, zmieša so syntetickými fragmentami 8A/B uvedený v sekvencii identifikačného čísla 13 a 8A/B uvedený v sekvencii identifikačného čísla 14 a liguje sa za vzniku konečnej konštrukcie, ktorá sa potom vloží do *E. coli* K-12 kmeň JM101, napr. dostupný od ATCC pod číslom 33 876, štandardnými spôsobmi. Po kul-

tivácii sa proteín extrahuje z buniek JM101. Zriedenie extraktov sa testuje na biologickú aktivitu.

Príklad 2

Expresia vIL-10 v opičích bunkách COS 7

Gén, ktorý kóduje otvorenú čítaciu oblasť pre vIL-10, sa amplifikuje polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) s použitím primérov, ktoré umožňujú neskoršie vloženie amplifikovaného fragmentu do vektora pcD(SRa) rozštiepeného pôsobením EcoRI (obrázok 1). Kódujúce vlákno vloženého fragmentu je uvedené v sekvencii identifikačného čísla 15.

Klony, ktoré nesú inzert v príslušnej orientácii, sa identifikujú expresiou vIL-10 alebo elektroforetickou zostavou reštrikčných štepov. Jeden taký vektor, nesúci gén vIL-10, sa označí pBCRF1(SRa). Tento vektor bol uložený v ATCC pod číslom 68 193. pBCRF1(SRa) sa amplifikuje v *E. coli* MC1061, izoluje sa štandardnými spôsobmi a použije sa na transfekciu opičích buniek COS 7 nasledujúcim spôsobom: Jeden deň pred transfekciou sa približne $1,5 \cdot 10^6$ opičích buniek COS 7 vysaje na jednotlivé 100 mm misky v Eaglovom médiu modifikovanom podľa Dulbecca (DME), ktoré obsahuje 5 % plodového telacieho séra (FCS) a 2 mM glutamínu. Na prevedenie transfekcie sa bunky COS 7 odstránia z misiek inkubáciou s trypsinom, premyjú sa dvakrát DME bez séra a suspendujú sa na množstvo 10^7 buniek/ml v DME bez séra. 0,75 ml podiel sa zmieša s 20 µg DNA a prenesie sa do sterilnej 0,4 cm elektroporačnej kyvety. Po 10 minútach sa na bunky pôsobí pulzom 200 voltov, 960 µF v jednotke BioRad Gene Pulser. Po ďalších desiatich minútach sa bunky odstránia z kyvety a pridajú sa k 20 ml DME obsahujúceho 5 % FCS, 2 mM glutamínu, penicilín, streptomycín a gentamycín. Táto zmes sa rozdelí na rovnaké diely do štyroch 10 mm misiek na tkanivovej kultúry. Po 12 až 24 hodinách pri 37 °C a 5 % oxidu uhličitého sa médium nahradí podobným médiom, ktoré obsahuje iba 1 % FCS a v inkubácii sa pokračuje ďalších 72 hodín pri 37 °C s 5 % CO₂. Potom sa médium izoluje a testuje sa na schopnosť inhibovať syntézu IFN- γ .

Desaťmilimetrové podiely čerstvo izolovaných PBL (asi $2 \cdot 10^6$ buniek/ml) sa inkubujú pri 37 °C s PHA (100 ng/ml) v médiu, ktoré pozostáva z i) 90 % DME doplneného 5 % FCS a 2 mM glutamínu a ii) 10 % supernatantu z buniek COS 7 vopred spracovaných s pBCRF1(SR α). Po 24 hodinách sa bunky a supernatanty izolujú a testujú sa na prítomnosť buď IFN- γ mRNA, alebo IFN- γ proteínu. Kontroly boli pripravené rovnakým spôsobom až na to, že 10 % supernatantu z kultúry COS 7 bolo vopred transfektované s plazmidom nesúcim nepríbuzný cDNA inzert. vIL-10 spracované vzorky vykazovali asi 50 % inhibíciu syntézy IFN- γ vzhľadom na kontrolu.

Príklad 3

Expresia vIL-10 v *E. coli*

Gén, ktorý kóduje maturovaný vIL-10 v sekvencii identifikačného čísla 4, môže byť expresovaný v *E. coli*.

cDNA inzert pBCRF1(SR α) sa reklonuje do plazmidu M13, kde sa zmení dvojitou miestne riadenou mutagenciou: Najskôr sa vytvorí miesto ClaI na 5-konci kódujúcej oblasti na maturovaný vIL-10 polypeptid, a potom sa vytvorí miesto BamHI na 3-konci kódujúcej oblasti na maturovaný vIL-10 polypeptid. Mutovaná sekvencia sa potom ihneď vloží do ďalej opísaného TRPC11 expresného vektora.

Vektor TRPC11 sa skonštruuje ligáciou syntetického súhlasného RBS fragmentu a ClaI linkery (ATCCAT) a

klonovaním výsledných fragmentov do pMT11hc (ktorý bol vopred modifikovaný tak, aby obsahoval miesto ClaI) rozštiepeného pôsobením ClaI. pMT11hc je malý (2300 párov nukleotidov) AMF^R, TET^R derivát plazmidu pBR322 pri vysokom počte kópií, ktorý nesie Eco-HindIII polylinkerovú oblasť plazmidu μ VX/ μ VX, je opísané Maniatismom a spol.: „Molecular Cloning: A Laboratory Manual“, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Tento plazmid bol modifikovaný tak, aby obsahoval miesto ClaI štiepením pMT11hc pôsobením EcoRI a BamHI, doplnením výsledných prečnievajúcich koncov a ligácií s ClaI linkerom (CATCSATG). Obnoví sa tak miesto EcoRI a BamHI a miesto Smal sa nahradí miestom ClaI. Jeden transformant z konštrukcie TRPC11 mal tandem RBS sekvencie obklopený miestami ClaI. Jedno z ClaI miest a časť druhej kópie RBS sekvencie sa odstráni rozštiepením tohto plazmidu pôsobením PstI, spracovaným s nukleázou Ba131, štiepením pôsobením EcoRI a reakciou s T4 DNA polymerázou v prítomnosti všetkých štyroch deoxynukleotidtrifosfátov. Výsledné fragmenty pri 30 až 40 pároch nukleotidov boli izolované PAGE a klonované do pUC12 rozštiepeného pôsobením Smal. *E. coli* trpP nesúci EcoRI fragment pri 248 pároch nukleotidov odvodený od pKC101 (opísaný Nicholsom a spol. v Methods in Enzymology 101, str. 155 (Academic Press, N. Y. 1983)) sa potom klonuje do miesta EcoRI. Doplní sa tak konštrukcia TRPC11, ktorá je ilustrovaná na obrázku 2. TRPC11 sa použije ako vektor pre vIL-10 najskôr rozštiepením pôsobením ClaI a BamHI, vyčistením a potom zmiešaním v štandardnom ligačnom roztoku s ClaI-BamHI fragmentom M13 obsahujúcim sekvenciu nukleotidov kódujúci maturovaný BCRF1. TRPC11, ktorý obsahuje inzert, označený ako TRPC11 BCRF1, sa množí v *E. coli* K12 kmeň JM101, napr. dostupnom z ATCC pod číslom 33 876.

Príklad 4

Potlačenie nádorov u myši účinkom IL-120

Vplyv IL-10 na rast nádorov bol testovaný v teste podobnom tomu, ktorý opísal Tepper a spol.: Cell 57, 503 až 512 (1989). Stručne tento test, ako je tu používaný, zahŕňa oddelené injekčné podanie dvoch skupín buniek syngénne nádorové bunkové línie myšiam; jedna skupina je stabilne transfektovaná plazmidom expresujúcim IL-10, druhá skupina znamená netransfektovanú kontrolu. Potom sa porovná výskyt tvorby nádorov u myši, ktorým boli injekčne podané bunky týchto dvoch skupín.

Vo všetkých pokusoch boli myšiam BALB/c injekčne podané buď transfektované, alebo netransfektované NSI myelomové nádorové bunky, ktoré sú dostupné z ATCC pod číslom TIB 18. Bunky NSI boli transfektované elektroporáciou plazmidom pGSRG (ilustrovaným na obrázku 3) nesúcim otvorenú čítaciu oblasť (ORF) myšieho IL-10, vírového IL-10 alebo ľudského IL-10 vloženú do reštrikčného miesta XhoI. pGSRG obsahuje marker na stanovenie stabilne transfektovaných buniek NSI a je derivátom pSVDt opísaným Schneem a spol.: Proc. Natl. Acad. Sci. 84, 6904 až 6908 (1987). IL-10 inzerty na pGSRG sa získavajú nasledujúcim postupom. PCR priméry obsahujúce sekvencie EcoRI linkera sa pripravia pre každú z plazmidov pH5C, pBCRF1 a pcD(SRa)-F115 tak, aby sa ORF príslušných cDNA inzertov mohli amplifikovať. Amplifikované ORF sa reklonujú do pcD(SRa) vektorov rozštiepených pôsobením EcoRI a oddelene sa expresujú tak, aby sa vybrali vektory, ktoré obsahujú ORF so správnou orientáciou. A konečne sa XhoI fragmenty plazmidov pcD(SRa) reklonujú do príslušných pGSRG plazmidov rozštiepených pôsobením XhoI.

Bunky NSI sa transfektujú plazmidom pGSRG nasledujúcim spôsobom. Bunky (2 až $3 \cdot 10^6$) z polokonfluentnej 100 mm Petriho misky sa odstreďujú, premyjú sa raz 10 ml sterilného fosforečnanom pufovaného sterilného solného roztoku (PBS), odstreďujú a resuspendujú v 0,5 ml PBS. V 1 ml PBS sa suspenduje 20 až 100 µg plazmidového DNA. Bunky sa zmiešajú s DNA, umiestnia sa do kvety v ľade a elektricky sa na ne pôsobí šokmi v zariadení Bio-Rad Gene Pulser nastavenom na kapacitu 960 mikrofara-
dov a 200 až 300 voltov. Po desiatich minútach v ľade sa bunky vysajú na štandardnú mikrotitrovaciu dosku s 96 jamkami v objeme 100 µl. Po 48 až 78 hodinách sa do každej jamky pridá 100 µl selekčného média s mykofenolovou kyselinou (0,5 µg/ml mykofenolovej kyseliny, 100 µg na ml xantínu, 15 µg/ml hypoxantínu, 12 až 15 % plodového teľacieho séra, 600 ufi/ml glutamínu v DME High glukóze).

V prvom pokuse sa intraperitoneálnou injekciou 4, 3, 4 a 5 myšiám podá $5 \cdot 10^6$ netransformovaných buniek (kontrola), pGSRG-mIL10-transformovaných buniek, pGSRG-vIL10-transformovaných buniek a pGSRG-hIL10-transformovaných buniek. Po štyroch týždňoch sa trom zo štyroch kontrolných myši vyvinuli viditeľné nádory. U žiadnej z pokusných myši sa nevyvinuli nádory počas 4 týždňov.

V druhom pokuse sa intraperitoneálnou injekciou 16 myšiám podá $5 \cdot 10^6$ netransformovaných buniek a 15 myšiám sa intraperitoneálne podá $5 \cdot 10^6$ pGSRG-mIL10-transformovaných buniek. Po dvoch týždňoch sa ôsmim kontrolným myšiám znovu injekčne podá $5 \cdot 10^6$ netransformovaných buniek a 7 z 15 myši $5 \cdot 10^6$ pGSRG-mIL10-transformovaných buniek. Po štyroch týždňoch od pôvodných injekcií sa myši skúmajú na prítomnosť vývoja nádorov. U 16 zo 16 kontrolných myši boli vyvinuté viditeľné nádory. U žiadnej z pokusných myši sa nevyvinuli žiadne známky nádorov.

Opisy predchádzajúcich usporiadaní podľa vynálezu sú tu opísané na ilustráciu. Nie sú zamýšľané ako vyčerpávajúce alebo ako obmedzujúce tento vynález na presné, tu opísané formy. Je zrejmé, že okrem uvedeného opisu existuje veľa modifikácií a variácií. Tieto usporiadania boli vybrané a opísané, aby najlepšie vysvetlili princípy tohto vynálezu a tým umožnili iným zručným odborníkom čo najlepšie využiť vynález v rôznych usporiadaniach a s rôznymi modifikáciami podľa toho, ako je potrebné. Rozsah vynálezu je definovaný pripojenými bodmi patentových nárokov.

Žiadatelia uložili kultúry *E. coli* MC1061 nesúce pHSC, pH15C a pBCRF(SRa) v Americkej zbierke typov kultúr (American Type Culture Collection), Rockville, Md., USA (ATCC) pod číslami 68 191, 68 192 a 68 193. Tieto zloženia boli uskutočnené za podmienok stanovených ATCC dohodou o ukladaní kultúr na patentové účely, podľa ktorej sa zaisťuje, že zloženia budú dostupné USA úradu pre patenty a ochranné známky podľa 35 USC 122 a 37 CFR 1.14 a budú verejne dostupné po vydaní USA patentu, čo vyžaduje, aby tieto uloženia boli uchovávané. Dostupnosť uloženého kmeňa nie je konštruovaná ako licencia k praktickému využívaniu vynálezu v rozpore s právami garantovanými autoritou akejkoľvek vlády v súlade s jej patentovými zákonmi.

V nasledujúcej časti tohto spisu je uvedený zoznam sekvencií.

Sekvencia identifikačné číslo: 1
Typ sekvencie: aminokyselinová
Dĺžka sekvencie: 178 zvyškov aminokyselín
Druh vlákna: jednovláknová
Topológia: lineárna

Typ molekuly: proteín

Pôvodný zdroj (organizmus): človek

Vlastnosti: ľudský IL-10 (ľudský inhibičný faktor syntézy cytokínu, ľudský CSIF)

Met	His	Ser	Ser	Ala	Leu	Leu	Cys	Cys	Leu	Val	Leu	Leu	Thr	Gly
				5					10					15
Val	Arg	Ala	Ser	Pro	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Ser	Glu	Asn	Ser	Cys
				20					25					30
Thr	His	Phe	Pro	Gly	Asn	Leu	Pro	Asn	Met	Leu	Arg	Asp	Leu	Arg
				35					40					45
Asp	Ala	Phe	Ser	Arg	Val	Lys	Thr	Phe	Phe	Glu	Met	Lys	Asp	Gln
				50					55					60
Leu	Asp	Asn	Leu	Leu	Leu	Lys	Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Phe	Lys
				65					70					75
Gly	Tyr	Leu	Gly	Cys	Gln	Ala	Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Phe	Tyr
				80					85					90
Leu	Glu	Glu	Val	Met	Pro	Gln	Ala	Glu	Asn	Gln	Asp	Pro	Asp	Ile
				95					100					105
Lys	Ala	His	Val	Asn	Ser	Leu	Gly	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg
				110					115					120
Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Cys	His	Arg	Phe	Leu	Pro	Cys	Glu	Asn	Lys
				125					130					135
Ser	Lys	Ala	Val	Glu	Gln	Val	Lys	Asn	Ala	Phe	Asn	Lys	Leu	Gln
				140					145					150
Glu	Lys	Gly	Ile	Tyr	Lys	Ala	Met	Ser	Glu	Phe	Asp	Ile	Phe	Ile
				155					160					165
Asn	Tyr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Met	Thr	Met	Lys	Ile	Arg	Asn		
				170					175					

Sekvencia identifikačné číslo: 2

Typ sekvencie: aminokyselinová

Dĺžka sekvencie: 170 zvyškov aminokyselín

Druh vlákna: jednovláknová

Topológia: lineárna

Typ molekuly: proteín

Vlastnosti: vírusový IL-10 (BCRF1)

Met	Glu	Arg	Arg	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Gln	Cys	Leu	Val	Leu	Leu
				5					10					15
Tyr	Leu	Ala	Pro	Glu	Cys	Gly	Gly	Thr	Asp	Gln	Cys	Asp	Asn	Phe
				20					25					30
Pro	Gln	Met	Leu	Arg	Asp	Leu	Arg	Asp	Ala	Phe	Ser	Arg	Val	Lys
				35					40					45
Thr	Phe	Phe	Gln	Thr	Lys	Asp	Glu	Val	Asp	Asn	Leu	Leu	Leu	Lys
				50					55					60
Glu	Ser	Leu	Leu	Glu	Asp	Phe	Lys	Gly	Tyr	Leu	Gly	Cys	Gln	Ala
				65					70					75
Leu	Ser	Glu	Met	Ile	Gln	Phe	Tyr	Leu	Glu	Glu	Val	Met	Pro	Gln
				80					85					90
Ala	Glu	Asn	Gln	Asp	Pro	Glu	Ala	Lys	Asp	His	Val	Asn	Ser	Leu
				95					100					105
Gly	Glu	Asn	Leu	Lys	Thr	Leu	Arg	Leu	Arg	Leu	Arg	Arg	Cys	His
				110					115					120
Arg	Phe	Leu	Pro	Cys	Glu	Asn	Lys	Ser	Lys	Ala	Val	Gln	Gln	Ile
				125					130					135
Lys	Asn	Ala	Phe	Asn	Lys	Leu	Gln	Gln	Lys	Gly	Ile	Tyr	Lys	Ala
				140					145					150
Met	Ser	Glu	Phe	Asp	Ile	Phe	Ile	Asn	Tyr	Ile	Glu	Ala	Tyr	Met
				155					160					165
Thr	Ile	Lys	Ala	Arg										
				170										

Sekvencia identifikačné číslo: 3

Typ sekvencie: aminokyselinová

Dĺžka sekvencie: 160 zvyškov aminokyselín

Druh vlákna: jednovláknová

Topológia: lineárna

Typ molekuly: proteín

Pôvodný zdroj (organizmus): človek

Vlastnosti: maturovaný ľudský IL-10 (maturovaný ľudský CSIF)

SK 279556 B6

Ser Pro Gly Gln Gly Thr Glu Ser Glu Asn Ser Cys Thr His Phe
 5 10 15
 Pro Gly Asn Leu Pro Asn Met Leu Arg Asp Leu Arg Asp Ala Phe
 20 25 30
 Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Glu Met Lys Asp Glu Leu Asp Asn
 35 40 45
 Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys Gly Tyr Leu
 50 55 60
 Gly Cys Glu Ala Leu Ser Glu Met Ile Glu Phe Tyr Leu Glu Glu
 65 70 75
 Val Met Pro Glu Ala Glu Asn Glu Asp Pro Asp Ile Lys Ala His
 80 85 90
 Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg Leu Arg Leu
 95 100 105
 Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys Ser Lys Ala
 110 115 120
 Val Glu Gln Val Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Glu Glu Lys Gly
 125 130 135
 Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile Asn Tyr Ile
 140 145 150
 Glu Ala Tyr Met Thr Met Lys Ile Arg Asn
 155 160

Sekvencia identifikačné číslo: 4
 Typ sekvencie: aminokyselinová
 Dĺžka sekvencie: 147 zvyškov aminokyselín
 Druh vlákna: jednovláknová
 Topológia: lineárna
 Typ molekuly: proteín
 Vlastnosti: vírusový IL-10 (BCRF1)

Thr Asp Gln Cys Asp Asn Phe Pro Glu Met Leu Arg Asp Leu Arg
 5 10 15
 Asp Ala Phe Ser Arg Val Lys Thr Phe Phe Gln Thr Lys Asp Glu
 20 25 30
 Val Asp Asn Leu Leu Leu Lys Glu Ser Leu Leu Glu Asp Phe Lys
 35 40 45
 Gly Tyr Leu Gly Cys Glu Ala Leu Ser Glu Met Ile Glu Phe Tyr
 50 55 60
 Leu Glu Glu Val Met Pro Glu Ala Glu Asn Glu Asp Pro Glu Ala
 65 70 75
 Lys Asp His Val Asn Ser Leu Gly Glu Asn Leu Lys Thr Leu Arg
 80 85 90
 Leu Arg Leu Arg Arg Cys His Arg Phe Leu Pro Cys Glu Asn Lys
 95 100 105
 Ser Lys Ala Val Glu Glu Ile Lys Asn Ala Phe Asn Lys Leu Glu
 110 115 120
 Glu Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Met Ser Glu Phe Asp Ile Phe Ile
 125 130 135
 Asn Tyr Ile Glu Ala Tyr Met Thr Ile Lys Ala Arg
 140 145

Sekvencia identifikačné číslo: 5
 Typ sekvencie: nukleotid
 Dĺžka sekvencie: 15 nukleotidov
 Druh vlákna: jednovláknová
 Topológia: lineárna
 Typ molekuly: DNA
 Bezprostredný experimentálny zdroj: syntetická (komerčná, Pharmacia)
 Vlastnosti: dvojláknový fragment kódujúci súhlasné ribozómové väzobné miesta

GTAAGGAGGT TTAAC

Sekvencia identifikačné číslo: 6
 Typ sekvencie: nukleotid
 Dĺžka sekvencie: 56 párov nukleotidov s prečnievajúcim koncom so 4 nukleotidmi
 Druh vlákna: dvojláknové
 Topológia: lineárna
 Typ molekuly: DNA
 Bezprostredný experimentálny zdroj: syntetická

Charakteristika: malé písmena znamenajú, že nukleotid sa líši od nukleotidu prírodnou sekvenciou v rovnakom mieste
 Vlastnosti: fragment IA/B syntetického CSIF génu

AGCCCAGGCC AGGGCACCCA GTCTGAGAAC AGCTGCACCG ACTTCCCAGG 50
 TCGGGTCCGG TCCCGTGGGT CAGACTCTTG TCCAAGTGGG TGAAGGGTCC
 TAACCGgtac 60
 aTTGgc

Sekvencia identifikačné číslo: 7
 Typ sekvencie: nukleotid
 Dĺžka sekvencie: 48 párov s prečnievajúcimi koncami s 5 a 9 nukleotidmi
 Druh vlákna: dvojláknové
 Topológia: lineárna
 Typ molekuly: DNA
 Bezprostredný experimentálny zdroj: syntetická
 Charakteristika: malé písmená znamenajú, že nukleotid sa líši od nukleotidu prírodnou sekvenciou v rovnakom mieste
 Vlastnosti: fragment 2A/B syntetického CSIF génu

GTAACCTGCC TAACATCCTT CGAGATCTCC GAGATGGCTT CAGCAGAGTG 50
 GACCG ATTGTACGAA GCTCTAGAGG CTCTAAGGAA GTGCTCTCAC
 AAGACTTTCT TT 62
 TTC

Sekvencia identifikačné číslo: 8
 Typ sekvencie: nukleotid
 Dĺžka sekvencie: 35 párov nukleotidov s prečnievajúcim koncom s 9 nukleotidmi
 Druh vlákna: dvojláknové
 Topológia: lineárna
 Typ molekuly: DNA
 Bezprostredný experimentálny zdroj: syntetická
 Charakteristika: malé písmená znamenajú, že nukleotid sa líši od nukleotidu prírodnou sekvenciou v rovnakom mieste
 Vlastnosti: fragment 3A/B syntetického CSIF génu

C AAATGAAGGA TCAGCTGGAC AACTTGTCT TAAG 35
 TGAAGAAAAG TTTACTTCTT ACTCGACCTG TTGAAGAAAG aTTC

Sekvencia identifikačné číslo: 9
 Typ sekvencie: nukleotid
 Dĺžka sekvencie: 69 párov nukleotidov s prečnievajúcim koncom so 4 nukleotidmi
 Druh vlákna: dvojláknové
 Topológia: lineárna
 Typ molekuly: DNA
 Bezprostredný experimentálny zdroj: syntetická
 Charakteristika: malé písmená znamenajú, že nukleotid sa líši od nukleotidu prírodnou sekvenciou v rovnakom mieste
 Vlastnosti: fragment 4A/B syntetického CSIF génu

GACTCCTTGC TGGAGGACTT TAAGGGTTAC CTGGGTGGCC AAGCCTTGTG 50
 CTCAGGAACG ACCTCCTGAA ATTCCCAATG GACCCAACGG TTGGGAACAG
 TGAGATGATC CAGTTTAT 69
 ACTCTACTAG GTCAAAATAG ATC

Sekvencia identifikačné číslo: 10
 Typ sekvencie: nukleotid
 Dĺžka sekvencie: 61 párov nukleotidov s prečnievajúcim koncom so 4 nukleotidmi
 Druh vlákna: dvojláknové
 Topológia: lineárna

Typ molekuly: DNA

Bezprostredný experimentálny zdroj: syntetická

Charakteristika: malé písmená znamenajú, že nukleotid sa líši od nukleotidu prírodnou sekvenciou v rovnakom mieste

Vlastnosti: fragment 5A/B syntetického CSIF génu

```
CTaGAGGAGG TGATGCGGCA AGCTGAGAAC CAaGACCCAG ACATCAAGGC 50
GAtCTCTCC ACIACGGGGT TCGACTCTTG GTTCTGGGTC TGTAGTCCG

GCATGTTAAC g 61
CGTACaATTG cagct
```

Sekvencia identifikačné číslo: 11

Typ sekvencie: nukleotid

Dĺžka sekvencie: 61 párov nukleotidov s prečnievajúcim koncom so 4 nukleotidmi

Druh vlákna: dvojvláknové

Topológia: lineárna

Typ molekuly: DNA

Bezprostredný experimentálny zdroj: syntetická

Charakteristika: malé písmená znamenajú, že nukleotid sa líši od nukleotidu prírodnou sekvenciou v rovnakom mieste

Vlastnosti: fragment 6A/B syntetického CSIF génu

```
AACTCCCTGG GGGAGAACCt GAAGACCCCTC AGCGTAGGCG TACGGCGCTG 50
TTGAGGGACC CCGTCTGGGA CTCTGCGGAG TCGACTCCG ATGCCGGGAC

TCATOGATct gca 63
AGTAGCTAG
```

Sekvencia identifikačné číslo: 12

Typ sekvencie: nukleotid

Dĺžka sekvencie:

Druh vlákna: dvojvláknové

Topológia: lineárna

Typ molekuly: DNA

Bezprostredný experimentálny zdroj: syntetická

Charakteristika: malé písmená znamenajú, že nukleotid sa líši od nukleotidu prírodnou sekvenciou v rovnakom mieste

Vlastnosti: fragment 7A/B syntetického CSIF génu

```
gGATTTCTTC CCTGTCAAAA CAAGAGGAAG GCCGTGGAGC AGGTGAAGAA 50
TAAAGAAG GGACAGTTTT GTTCTGGTTC CGGCACCTCG TCCACTTCTT

cGGgTgcatg 60
gCGcAc
```

Sekvencia identifikačné číslo: 13

Typ sekvencie: nukleotid

Dĺžka sekvencie: 45 párov nukleotidov s prečnievajúcimi koncami so 4 a 9 nukleotidmi

Druh vlákna: dvojvláknové

Topológia: lineárna

Typ molekuly: DNA

Bezprostredný experimentálny zdroj: syntetická

Charakteristika: malé písmená znamenajú, že nukleotid sa líši od nukleotidu prírodnou sekvenciou v rovnakom mieste

Vlastnosti: fragment 8A/B syntetického CSIF génu

```
CGCGTTTATT AATAAGCTCC AAGACAAAGC CATCTACAAA GCCATGAGTG 50
AAATTA TTATTCCAGG TTCTGTCTCC GTAGATGTTT CGGTACTCA

AGTTTGAC 58
```

Sekvencia identifikačné číslo: 14

Typ sekvencie: nukleotid

Dĺžka sekvencie: 51 párov nukleotidov s prečnievajúcimi koncami s 9 a 4 nukleotidmi

Druh vlákna: dvojvláknová

Topológia: lineárna

Typ molekuly: DNA

Bezprostredný experimentálny zdroj: syntetická

Charakteristika: malé písmená znamenajú, že nukleotid sa líši od nukleotidu prírodnou sekvenciou v rovnakom mieste

Vlastnosti: fragment 9A/B syntetického CSIF génu

```
▲ TCTTCATCAA CTACATAGAA GCCTACATGA CAATGAAGAT 50
CTCAAACGTG AGAAGTACTT GATGTATCTT CGGATGTA CTACTTCTA

ACGAAACTGA 60
TGCTTTGACT tca*
```

Sekvencia identifikačné číslo: 15

Typ sekvencie: nukleotid

Dĺžka sekvencie: 499 nukleotidov

Druh vlákna: jednovláknová

Topológia: lineárna

Typ molekuly: DNA

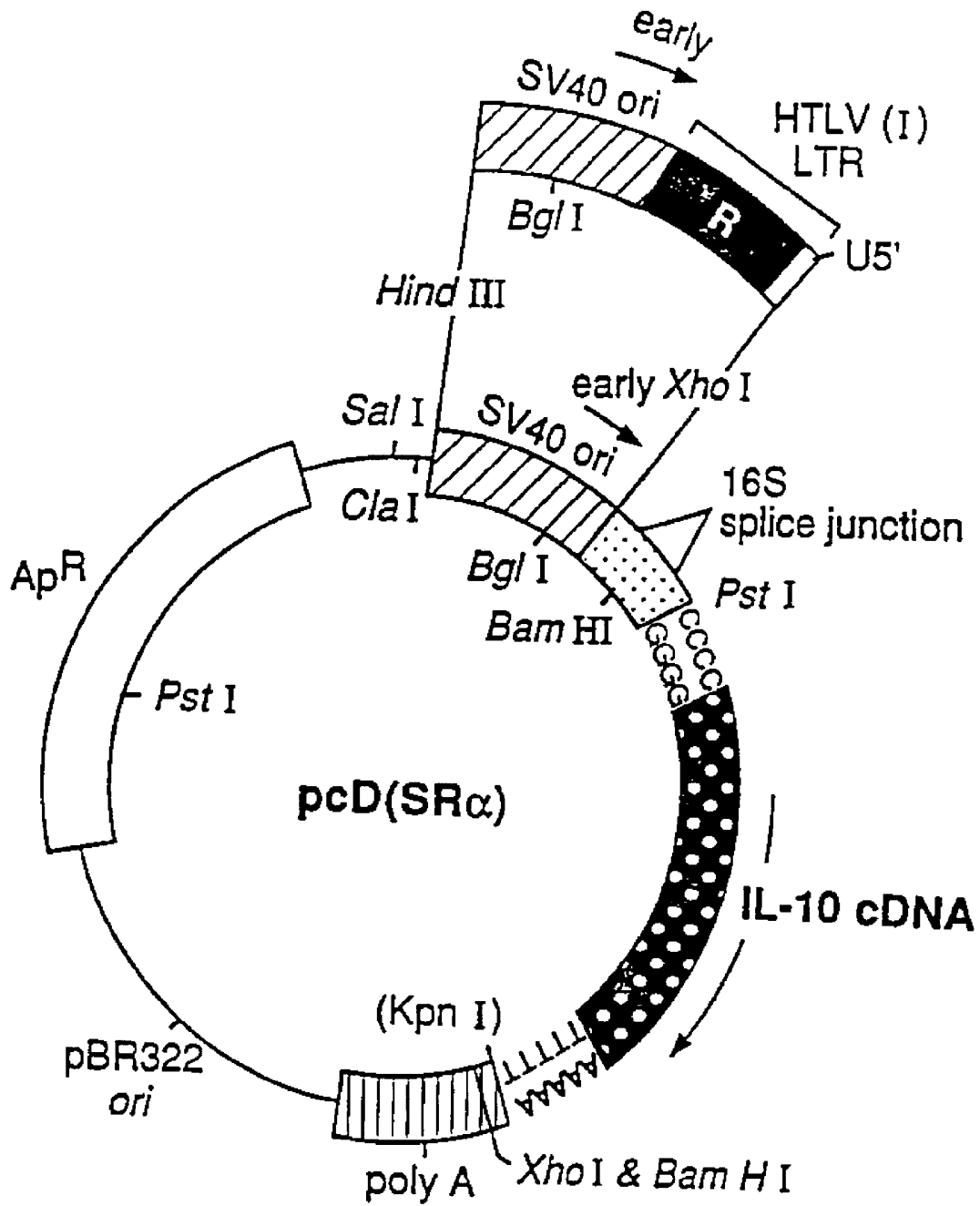
Vlastnosti: kóduje vírusový IL-10

```
AATTC ATG GAG CGA AGG TTA GIG GTC ACT CTG GAG TGC CTC GTG 44
CTG CTT TAC CTG GCA CCT GAG TGT GGA GGT ACA GAC CAa TGT 86
GAC AAT TTT CCC GAA ATG TTG AGG GAC CTA AaA GAT GCG TTC 128
AGT CGT GTT AAA ACC TTT TTC CAG ACA AAG GAC GAC CTA GAT 170
AAC CTT TTG CTC AAG GAG TCT CTG CTA GAG GAC TTT AAG GGC 212
TAC CTT GGA TGC CAG GGC CTB TCA CAa ATG ATC CAa TTC TAC 254
CTG GAG GAA GTC ATG CCA CAG GCT GAA AAC CAG GAC CCG GAG 296
GCT AAG GAC CAT GTC AAT TCT TTG GGT GGA AAT CTA AAG ACC 338
CTA CCG CTC CCG CTG CCG AGG TGC CAC AGG TFC CTG CCC TGT 380
GAG AAC AAG AGT AaA GCT CTG GAA CAG ATA AaA AAT GCC TTT 422
AAC AAG CTG CAG GAA AaA GGA ATT TAC AaA GCC ATG AGT GAA 464
TTT GAC ATT TTT ATT AaC TAC ATA GAA GCA TAC ATG ACA ATT 506
AaA GCC AGG TGA G 519
```

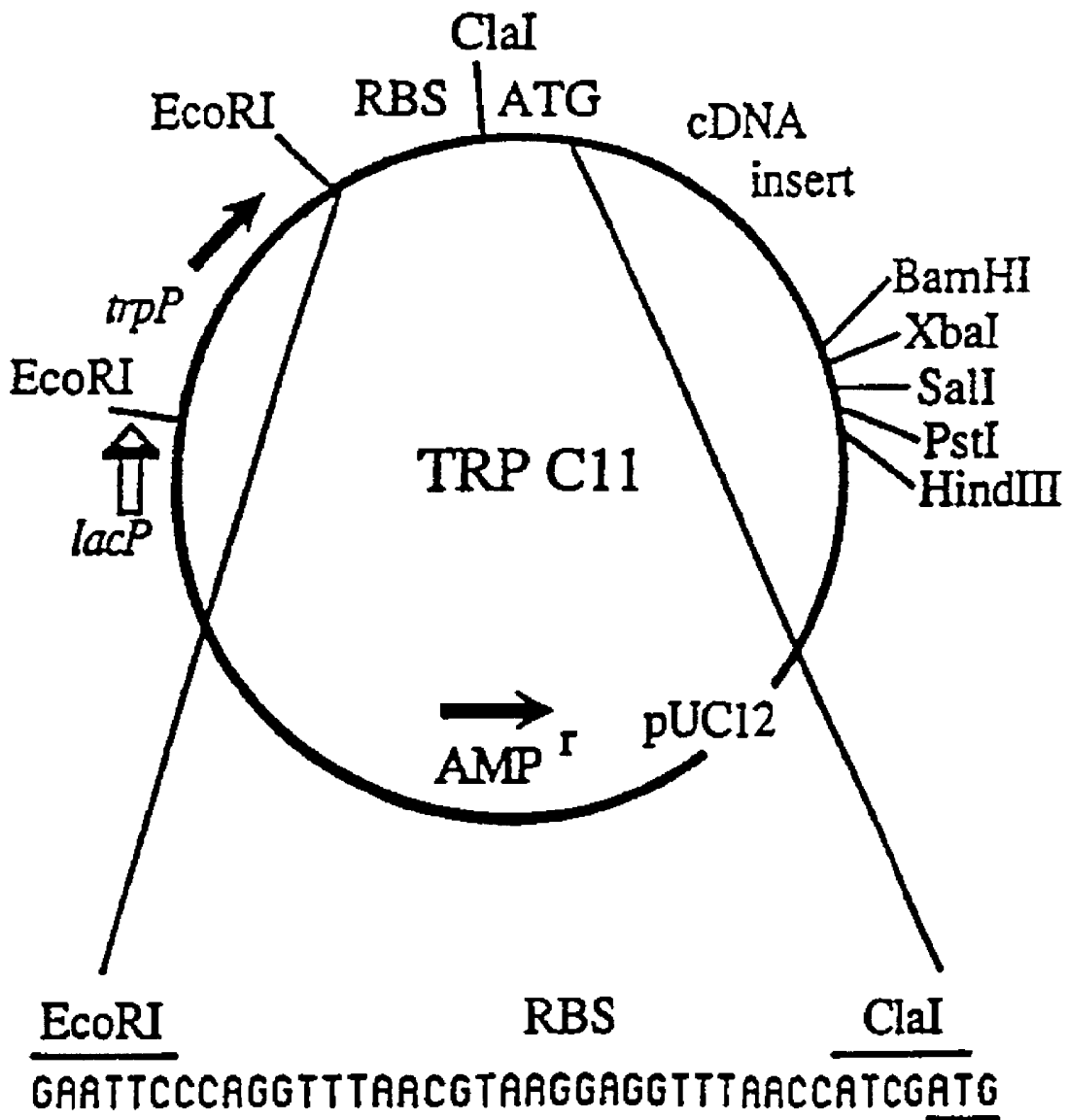
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použitie interleukínu-10 na prípravu liečiva na liečenie nádorov pacienta.
2. Použitie podľa nároku 1, kde uvedený interleukín-10 je vybraný zo skupiny pozostávajúcej z vírusového interleukínu-10 a ľudského interleukínu-10.
3. Použitie podľa nároku 1, kde uvedené liečivo je vo forme kontinuálnej infúzie vhodnej na podanie interleukínu-10.
4. Použitie podľa nároku 3, kde množstvo interleukínu-10 v uvedenom liečive na podanie je v rozsahu 50 až 800 µg na deň.

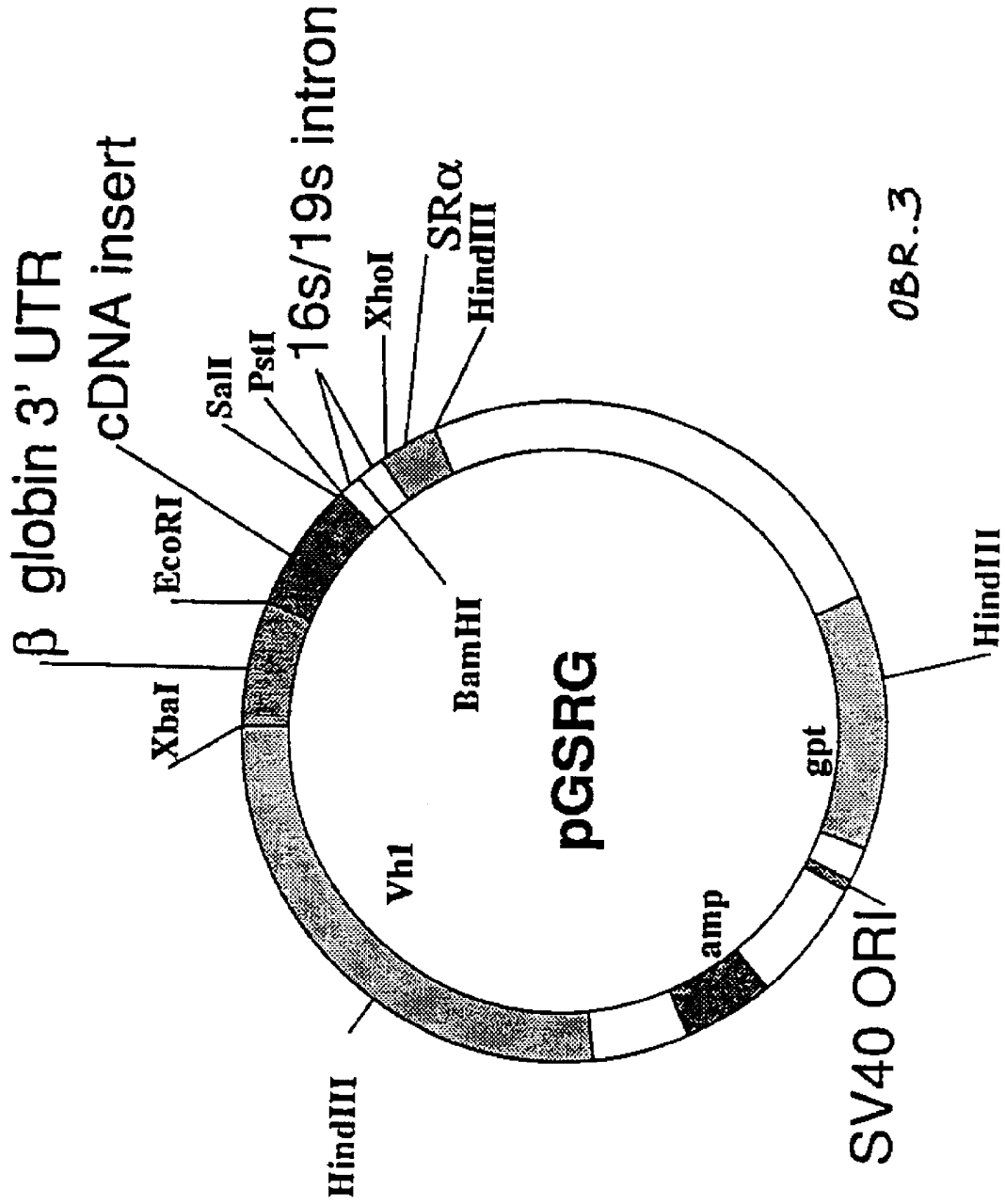
3 výkresy



OBR. 1



OBR. 2



Koniec dokumentu