



(19) Országkód

**HU**



**MAGYAR  
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR  
SZABADALMI  
HIVATAL**

## **SZABADALMI LEÍRÁS**

(11) Lajstromszám:

**219 264 B**

(21) A bejelentés ügyszám: P 95 01410  
(22) A bejelentés napja: 1993. 11. 12.  
(23) Módosítási elsőbbség: 1994. 07. 01.  
(30) Elsőbbségi adatok:  
07/978,891 1992. 11. 13. US  
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/US 93/10953  
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 94/11026

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

**A 61 K 39/395**  
C 12 N 15/02  
C 12 P 21/08  
A 61 K 43/00

(40) A közzététel napja: 1996. 06. 28.  
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi  
Közlönyben: 2001. 03. 28.

(72) Feltalálók:

Anderson, Darell R., Escondido, Kalifornia (US)  
Hanna, Nabil, Olivenhain, Kalifornia (US)  
Leonard, John E., Encinitas, Kalifornia (US)  
Newman, Roland A., San Diego, Kalifornia (US)  
Rastetter, William H., Rancho Santa Fe,  
Kalifornia (US)  
Reff, Mitchell E., San Diego, Kalifornia (US)

(73) Szabadalmas:

IDEC Pharmaceuticals Corp.,  
San Diego, Kalifornia (US)

(74) Képvisező:

DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.,  
Budapest

(54)

**A Bp35 B-sejtfelszíni antigén („CD20”) ellen termeltetett  
monoklonális ellenanyagok, kiméra-ellenanyagok,  
radioaktívan jelölt ellenanyagok,  
a monoklonális ellenanyagokat termelő hibridómasejtek  
és az ellenanyagok alkalmazása B-sejtes limfóma kezelésére**

KIVONAT

A találmány tárgyát a Bp35 B-sejtfelszíni antigén („CD20”) ellen termeltetett monoklonális ellenanyagok, kiméra-ellenanyagok, radioaktívan jelölt ellen-

anyagok és a monoklonális ellenanyagokat termelő hibridómasejtek képezik, valamint ezek alkalmazása B-sejtes limfóma kezelésére.

A találmány tárgyát a Bp35 B-sejtfelszíni antigén („CD20”) ellen termeltetett monoklonális ellenanyagok, kiméra-ellenanyagok, radioaktívan jelölt ellenanyagok és a monoklonális ellenanyagokat termelő hibridóma-sejtek képezik, valamint ezek alkalmazása B-sejtes limfóma kezelésére.

Ez a leírás az US 5.736.137 számon megadott amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentés részben folytatódó bejelentése. Ez a szabadalmi leírás összefüggésben áll az US 5.648.267 számon megadott amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben foglalt találmányi leírással, valamint az „Impaired dominant selectable marker sequence and intronic insertion strategies for enhancement of expression of gene product and expression vector systems comprising same” című US 5.648.267 számon megadott amerikai egyesült államokbeli szabadalmi bejelentésben foglalt találmányi leírással (melyet jelen leírással egyidejűleg nyújtunk be). Az említett találmányi leírások teljes terjedelmükben a jelen kitanítás részét képezik.

A gerincesek (például főemlősök, ezen belül az ember, emberszabású majmok és majmok stb.) immunrendszerét számos szerv és sejttípus építi fel, melyek az alábbi célokra fejlődtek ki: pontosan és specifikusan ismerjék fel a gerinces gazdaszervezetet megtámadó idegen mikroorganizmust („antigént”); specifikusan kötődjenek a fenti idegen mikroorganizmushoz; és távolítsák el/pusztítsák el az említett idegen mikroorganizmust. A limfociták, többek között, kritikus fontosságúak az immunrendszer számára. A limfociták a timuszban (csecsemőmirigyben), lépben és (a felnőtt) csontvelőben termelődnek, ezek a (felnőtt) emberi keringésben található összes fehérvérsejt körülbelül 30%-át képviselik. A limfocitáknak két fő alcsoportja ismert: T-sejtek és B-sejtek. A T-sejtek felelősek a sejt által közvetített immunitásért, míg a B-sejtek felelősek az ellenanyag-termelésért (humorális immunitásért). Bár a T-sejtek és B-sejtek függetlenek tekinthetők – a tipikus immunválasz során a T-sejtek aktiválása akkor jön létre, ha a T-sejt-receptor az antigént prezentáló sejt felszínén található fő hisztokompatibilitási komplex („MHC”) glikoproteinekhez kapcsolódó antigénfragmensekhez kötődik – az említett aktiválás biológiai mediátorok („interleukinek”) felszabadulását okozza, melyek lényegében úgy stimulálják a B-sejteket, hogy azok differenciálódjanak, és az antigénnel szemben ellenanyagot („immunoglobulint”) termeljenek.

A gazdaszervezetben valamennyi B-sejt felszínén különböző ellenanyagot expresszál – tehát az egyik B-sejt az egyik antigénnel szemben, míg egy másik B-sejt egy eltérő antigénnel szemben expresszál specifikus ellenanyagot. Ennek megfelelően a B-sejtek igen változatosak, és ez a változatosság kritikus fontosságú az immunrendszer számára. Emberben mindegyik B-sejt hatalmas számú ellenanyag-molekulát (körülbelül  $10^7$ – $10^8$  molekulát) képes előállítani. Az említett ellenanyag-termelés tipikus esetben az idegen antigén neutralizálódását követően megszűnik (vagy lényegesen csökken). Esetenként azonban, egy adott B-sejt proliferációja megállíthatatlanul folytatódik; az ilyen

proliferáció „B-sejtes limfómának” nevezett „rákhoz” vezethet.

Mind a T-sejtek, mind a B-sejtek differenciálódási és azonosítási „markerekként” felhasználható sejtfelszíni proteinek tartalmaznak. Egy ilyen humán B-sejt-marker a „CD20” elnevezéssel is illetett humán B-sejtre korlátozó Bp35 differenciálódási antigén. A CD20 a korai B-sejtfejlődési szakasz során expresszálódik, és a plazmasejtté való differenciálódásig megmarad. Közélebről a CD20-molekula szerepet játszhat a sejtciklus megindításához és a differenciálódáshoz szükséges aktivációs folyamatban betöltött lépés szabályozásában, és neoplasztikus („tumor”) B-sejtekben rendszerint igen magas szinten expresszálódik. A CD20 a meghatározás szerint megtalálható mind a „normális” B-sejteken, mind a „malignus” B-sejteken, azaz a megállíthatatlan proliferációs képességgel rendelkező, a B-sejtes limfóma létrejöttéhez vezető B-sejteken. A CD20 felületi antigén tehát alkalmazható lehet B-sejtes limfómák „célzott kezelésére”.

Az említett célzott kezelés lényegében az alábbiak szerint általánosítható: például injektálással, a B-sejtek CD20 felületi antigénjére specifikus ellenanyagokat juttatunk a betegbe, ezek a CD20-ellenanyagok (látszólag) mind a normális, mind a malignus B-sejtek CD20 sejtfelszíni antigénjeihez specifikusan kötődnek; a CD20 felületi antigénhez kötődött anti-CD20-ellenanyagok a neoplasztikus B-sejtek elpusztításához és eltávolításához vezethetnek.

Ezenkívül az anti-CD20-ellenanyaghoz a tumor elpusztítására képes kémiai hatóanyagok vagy radioaktívan jelölt anyagok köthetők, ily módon az anyagot specifikusan, például neoplasztikus B-sejtekhez „szállítjuk”. A megközelítési módtól függetlenül, az elsődleges cél a tumorsejtek elpusztítása: a specifikus megközelítési módot az alkalmazott anti-CD20-ellenanyag alapján határozhatjuk meg, tehát a CD20-antigént célzó, rendelkezésre álló megközelítési módok lényegesen különbözőek lehetnek.

Például közöltek a CD20 felületi antigént célzó ilyen próbálkozásokat. Az 1F5 egér monoklonális ellenanyagot (egy anti-CD20-ellenanyagot) folyamatos intravénás infúzióban adagolták B-sejtes limfómában szenvedő betegeknek. Kimutatták, hogy a keringő tumorsejtek eltávolításához különösen nagy mennyiségre (>2 grammra) volt szükség, és az eredményt „átmeneti eredményként” írták le. [Press és munkatársai: „Monoclonal Antibody 1F5 (anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas” Blood 69/2, 584 (1987)]. Ezzel a megközelítési móddal az a probléma merülhet fel, hogy a nem humán monoklonális ellenanyagok tipikusan nem rendelkeznek humán effektor működéssel, azaz többek között nem képesek komplementfüggő lízis közvetítésére vagy nem képesek ellenanyagfüggő sejttoxicitáson vagy Fc-receptor által közvetített fagocitózison keresztül létrejövő humán célsejtlizálásra. Továbbá a nem humán monoklonális ellenanyagokat a humán gazdaszervezet idegen proteinként ismerheti fel, ezért az ilyen idegen ellenanyagok ismételt injektálása káros túlérzékenységi reakciók kialakulásához vezet

immunválaszt válthat ki. Egérből származó monoklonális ellenanyagok esetében ezt gyakran „Humán Anti-Egér Ellenanyag”-válasznak vagy „HAMA”-válasznak nevezik. Ezenkívül ezeket az idegen ellenanyagokat megtámadhatja a gazdaszervezet immunrendszere, ennek hatásaképp azok a célzott hely elérését megelőzően neutralizálódnak.

Limfocitákra és limfómasejtekre jellemző, hogy több okból kifolyólag érzékenyek radioterápiára, ezek: a radioaktívan jelölt ellenanyagok által helyileg kibocsátott ionizáló sugárzás előlheti a sejteket azzal együtt vagy anélkül, hogy a célzott antigén (például a CD20) szoros közelségbe kerül az antigénhez kötött ellenanyaggal; a sugárzás áthatolóképessége feloldhatja azt a problémát, hogy az ellenanyag korlátozottan fér hozzá nagy kiterjedésű vagy rossz vérellátású tumorokhoz; valamint a szükséges ellenanyag összmenyisége csökkenthető. A radioaktív anyag radioaktív részecskéket bocsát ki, melyek a sejt DNS-ét addig a pontig károsítják, hogy a sejt „repair” (helyreállító) működései nem teszik már lehetővé a sejt fennmaradását, tehát ha a célsejtek tumorsejtek, a radioaktív jelölőanyag előnyösen előli a tumorsejteket. Radioaktívan jelölt ellenanyagok alkalmazásán olyan radioaktív anyagok használatát értjük, melyek alkalmazása óvintézkedéseket igényel mind a beteg számára (azaz esetleg csontvelő-átültetést), mind az egészségügyi személyzet részéről (azaz radioaktivitással történő munka esetén nagyfokú óvintézkedések betartására van szükség).

Az egér monoklonális ellenanyagok hatékonyságát B-sejtes rendellenességek kezelésére tehát úgy próbálták javítani, hogy az ellenanyaghoz egy radioaktív jelölőanyagot vagy toxint kapcsoltak, hogy a jelölőanyag vagy toxin a tumor helyén lokalizálódjon. A fent említett IF5-ellenanyagot például Jód-131-gyel („<sup>131</sup>I”-gyel) „jelölték” és két betegben értékelték annak biológiai megoszlását [lásd, Eary J. F. és munkatársai: „Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma” J. Nuc. Med. 31/8, 1257 (1990); valamint Press O. W. és munkatársai: „Treatment of Refractory Non-Hodgkin’s Lymphoma with Radiolabeled MB-1 (Anti-CD37) Antibody” J. Clin. Onc. 7/8, 1027 (1989), (mely szerint az egyik <sup>131</sup>I”-gyel kezelt beteg részlegesen reagált a kezelésre); Goldenberg D. M. és munkatársai: „Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphomas with Iodine-131-Labeled LL2 Monoclonal Antibody” J. Clin. Onc. 9/4, 548 (1991), (mely szerint több injekcióval részesült nyolc betegből háromnál HAMA-válasz-reakció lépett fel); Appelbaum F. R.: „Radiolabeled Monoclonal Antibodies in the Treatment of Non-Hodgkin’s Lymphoma” Hem./Onc. Clinics of N. A. 5/5, 1013 (1991), (összefoglaló közlemény); Press O. W. és munkatársai: „Radiolabeled Antibody Therapy of B-Cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support” New England Journal of Medicine 329/17, 1219–1223 (1993), (Jód-131-gyel jelölt IF5 és B1 anti-CD20-ellenanyagok); valamint Kaminski M. G. és munkatársai: „Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with (<sup>131</sup>I) Anti-B1 (Anti-CD20) Antibody” NEJM 329/7, (1993), (jód-131-jelölt B1 anti-

CD20-ellenanyag, a továbbiakban „Kaminski”-ellenanyag)].

Ellenanyaghoz konjugáltak toxinokat is (például kemoterápiás hatású anyagokat, mint például doxorubicint vagy mitomycin-C-t). [Lásd például a WO 92/07466 számú PCT közzétételi iratot (a nyilvánosságra jutás dátuma: 1992. május 14.)].

A „konjugált” ellenanyagok alternatívájaként fejlesztették ki a „kiméra”-ellenanyagokat, azaz két vagy több különböző fajból (például egérből és emberből) származó részletet tartalmazó ellenanyagokat. Például Liu A. Y. és munkatársai CD20-antigén ellen irányuló egér/humán kiméra-ellenanyagot írnak le [„Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biological Activity” J. Immun. 139/10, 3521 (1987)]. Lásd továbbá a WO 88/04936 számú PCT közzétételi iratot. A hivatkozásban nem áll rendelkezésre információ, azonban az ilyen kiméra-ellenanyagoknak B-sejtes rendellenességek kezelésében való alkalmazhatóságára, hatékonyságára vagy gyakorlatára vonatkozólag. Megjegyzendő, hogy *in vitro* funkcionális vizsgálati eljárások [például komplementfüggő lízis („CDC”); ellenanyag-függő citotoxicitás („ADCC”) stb.] nem alkalmasak egyértelműen a kiméra-ellenanyag *in vivo*, a specifikus antigént expresszáló célsejteket előlő vagy eltávolító képességének megítélésére. [Lásd például Robinson R. D. és munkatársai: „Chimeric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediate different anti-tumor cell biological activities” Hum. Antibod. Hybridomas 2, 84 (1991), (kimutathatatlan ADCC-aktivitással rendelkező egér-humán kiméra-ellenanyag)].

A kiméra-ellenanyagok lehetséges terápiás hatékonysága tehát valójában csak *in vivo* kísérletekkel határozható meg.

A technika állása szerint szükséges lenne és óriási előnyt jelentene tehát főemlősökben, valamint anélkül, hogy igényünket az alábbira korlátoznánk emberben B-sejtes limfóma kezelésére alkalmazható, a CD20-antigént célzó terápiás eljárás kifejlesztése.

Az alábbiakban összefoglaljuk a találmány szerinti megoldást.

A találmány tárgyát anti-CD20-ellenanyagok képezik B-sejtes rendellenességek, közelebbről B-sejtes limfómák kezelésére szolgáló terápiás eljárásokban történő alkalmazásra. Ezeknek az eljárásoknak az alapját a vérben található perifériás B-sejtek, ezen belül a limfómával kapcsolatos B-sejtek eltávolítása céljából immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok adagolása; lokalizált és perifériás B-sejt eredetű tumorok célzott kezelése céljából radioaktívan jelölt anti-CD20-ellenanyagok adagolása; valamint egy kooperatív terápiás stratégia keretében kiméra anti-CD20-ellenanyagok és radioaktívan jelölt anti-CD20-ellenanyagok adagolása képezi.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a leírásokhoz csatolt ábrákat.

Az 1. ábra immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok előállítására alkalmazható tandem kiméra-ellenanyag expressziós vektor („TCAE8”) diaramját mutatja.

A 2A–2E. ábrák az 1. ábra szerinti vektor nukleinsavszekvenciáját mutatják.

A 3A–3F. ábrák az 1. ábra szerinti vektor nukleinsavszekvenciáját mutatják, mely vektor ezenkívül egér könnyű és nehéz lánc variábilis régiókat tartalmaz („TCAE8-plazmidba klónozott anti-CD20”).

A 4. ábra 2B8 jelzésű egér anti-CD20 monoklonális ellenanyagból származó könnyű lánc variábilis régiójának (ezen belül a CDR és keretregiók) nukleinsav- és aminosavszekvenciáját mutatja.

Az 5. ábra 2B8 jelzésű egér anti-CD20 monoklonális ellenanyagból származó nehéz lánc variábilis régiójának (ezen belül a CDR és keretregiók) nukleinsav- és aminosavszekvenciáját mutatja.

A 6. ábra a „flow-citometriás” eredményeket ábrázolja, melyek fluoreszcensen jelölt humán C1q-nak kiméra anti-CD20-ellenanyaghoz történő kötődését bizonyítják, kontrollként jelölt C1q-t; jelölt C1q-t és 2B8 jelzésű egér anti-CD20 monoklonális ellenanyagot; valamint jelölt C1q-t és humán IgG1-t alkalmaztunk.

A 7. ábra komplement által közvetített lízis eredményeit mutatja, melyen kiméra anti-CD20-ellenanyagot és 2B8 jelzésű egér anti-CD20 monoklonális ellenanyagot hasonlítottunk össze.

A 8. ábra ellenanyag által közvetített sejtcitotoxicitás-vizsgálat eredményeit ábrázolja *in vivo* humán effektorsejtek alkalmazásával, mely vizsgálatban a kiméra anti-CD20-ellenanyagokat és a 2B8-ellenanyagokat hasonlítottuk össze.

A 9A., 9B. és 9C. ábrák nem humán főemlős perifériás vérében található B-limfociták eltávolításának eredményeit foglalja össze 0,4 mg/kg (A); 1,6 mg/kg (B); és 6,4 mg/kg (C) immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyag infúzióját követően.

A 10. ábra többek között, nem humán főemlős perifériás vérében található B-limfociták eltávolításának eredményeit mutatja 0,01 mg/kg immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyag infúzióját követően.

A 11. ábra az Y2B8 tumorölő hatását mutatja egérxenograft modellben, B-sejtes limfoblasztumor felhasználásával.

A 12. ábra a C2B8 tumorpusztító hatását mutatja egérxenograft modellben, B-sejtes limfoblasztumor felhasználásával.

A 13. ábra Y2B8 és C2B8 kombinációjának együttes tumorölő hatását mutatja egérxenograft modellben B-sejtes limfoblasztumor felhasználásával.

A 14A. és 14B. ábrák a C2B8 klinikai analízise I/II. fázisának eredményeit foglalják össze, melyek szerint a betegekben a B-sejtpopuláció a vizsgálati idő során csökkent, és a betegségben részleges remisszió (14A.) vagy kismértékű remisszió (14B.) jött létre.

Az alábbiakban részletesen ismertetjük a találmány szerinti megoldás előnyös megvalósítási módjait.

Az ellenanyagokat általánosságban két könnyű és két nehéz láncmolekula építi fel; ezek a láncok „Y” alakot formálnak, melyben az Y „karjainak” kialakításában mind a nehéz, mind a könnyű láncok részt vesznek, és a nehéz láncok képezik az Y alapját. A könnyű és ne-

héz láncokat strukturális és funkcionális homológia alapján doménokra osztjuk. Mind a könnyű láncok, mind a nehéz láncok variábilis doménjai („V<sub>L</sub>” és „V<sub>H</sub>”) a felismerőképességet és a specifitást határozzák meg. A könnyű és nehéz lánc konstans régiójának doménjai („C<sub>L</sub> és C<sub>H</sub>”) fontos biológiai sajátóságokért felelősek, például az ellenanyagláncok összekapcsolódásáért, a kiválasztásért, a placentán történő átjutásért, Fc-receptorhoz való kötődésért, komplement kötésért stb. Az ellenanyag-termelő sejtekben az immunglobulin gén expressziójához vezető folyamatok összetettek. A variábilis doménregiót kódoló génszekvenciák különböző őssejt eredetű génsztemenseken találhatóak, ezeket „V<sub>H</sub>”, „D” és „J<sub>H</sub>” vagy „V<sub>L</sub>” és „J<sub>L</sub>” sztemenseknek nevezzük. Ezek a génsztemensek DNS-átrendeződés révén kapcsolódnak össze, és képezik a nehéz és könnyű láncban expresszálandó teljes V-regiókat. Az átrendeződött és összekapcsolódott V-sztemensek (V<sub>L</sub>–J<sub>L</sub> és V<sub>H</sub>–D–J<sub>H</sub>) kódolják ezután a könnyű és nehéz lánc teljes variábilis régióit vagy antigénkötő doménjait.

Humán B-sejtes limfómák szeroterápiáját írják le anti-CD20 egér monoklonális ellenanyagok alkalmazásával Press és munkatársai [Blood 69, 584 (1987), lásd fent], az általuk közölt terápiás válaszreakciók, sajnos, átmenetinek bizonyultak. Ezenkívül a betegek 25%-ánál a szeroterápia hatására humán antiéger-ellenanyag (HAMA) válaszreakció lépett fel. Press és munkatársai szerint ezeknek az ellenanyagoknak toxinokkal vagy radioaktív izotópokkal konjugált formájával valószínűleg tartósabb klinikai eredmények érhetőek el, mint a nem konjugált ellenanyagokkal.

A B-sejtes limfómák gyengítő hatásából és az alkalmazható kezelési módokra való való igényből kiindulva különböző megvalósítási módokat dolgoztunk ki, melyek között a közös kapocs a 2B8-ellenanyag alkalmazása. Az egyik ilyen megvalósítási mód szerint az emlősrendszerek azon képességét aknázzuk ki előnyösen, hogy könnyen és hatékonyan pótolják a vérben található perifériás B-sejteket; a fenti megoldás alkalmazásával arra törekszünk, hogy a perifériás vérből és a limfatikus szövetekből lényegében eltávolítsuk a B-sejteket vagy nagymértékben csökkentjük a B-sejtek számát, ezáltal eltávolítsuk a B-sejtes limfómát. Ezt többek között, immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok alkalmazásával érjük el. Egy másik megvalósítási mód szerint a tumorsejteket radioaktív jelölés alkalmazásával célzottan kíséreljük meg elpusztítani.

„Anti-CD20-ellenanyagok” alatt olyan ellenanyagot értünk, amely specifikusan felismer egy 35 000 D molekulatömegű nem glikozilezett sejt felszíni foszfoproteint, melyet tipikusan humán B-limfocitákra korlátozó Bp35 differenciálódási antigénnek, közönségesen CD20-antigénnek neveznek. A „kiméra” kifejezés, amennyiben az az anti-CD20-ellenanyagokra vonatkozik, olyan ellenanyagokat jelöl, melyeket előnyösen rekombináns dezoxiribonukleinsav-technikákkal állítottunk elő, és amelyek mind humán (valamint immunológiailag rokon fajok, például csimpánz), mind nem hu-

mán eredetű összetevőket tartalmaznak: a kiméra-ellenanyag konstans régiója előnyösen lényegében megegyezik a természetes humán ellenanyag konstans régiójával; a kiméra-ellenanyag variábilis régiója előnyösen nem humán eredetű, és a CD20 sejtfelszíni antigént felismerő, kívánt antigénspecifitással rendelkezik. A nem humán forrás bármely olyan gerinces lehet, amely humán CD20 sejtfelszíni antigénnel vagy humán CD20 sejtfelszíni antigént tartalmazó anyaggal szemben ellenanyagok előállítására alkalmazható. Ilyen nem humán forrás lehet anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk: rágcsálók (például nyúl, patkány, egér stb.) és nem humán főemlősök (például óvilági majom, majom stb.). Legelőnyösebben a nem humán összetevő (a variábilis régió) egérből származik. „Immunológiai aktív” kifejezés alatt, amennyiben azt kiméra anti-CD20-ellenanyagokkal kapcsolatban használjuk, olyan kiméra-ellenanyagot értünk, amely humán C1q-hoz kötődik, humán B-limfoid sejtvonalak komplementfüggő lizálódását („CDC”-t) közvetíti, és ellenanyagfüggő sejt citotoxicitáson („ADCC”-on) keresztül lizálja a humán célsejteket. „Indirekt jelölés” és „indirekt jelölési megközelítési mód” alatt azt értjük, hogy az ellenanyaghoz egy kelátort kapcsolunk, és a kelátorba legalább egy radioaktív izotópot inszertálunk. Előnyös kelátorok és radioaktív izotópok leírása található az alábbi szakirodalmi helyen: Srivagtava S. C. és Mease R. C.: „Progress in Research on Ligands, Nuclides and Techniques for Labeling Monoclonal Antibodies”, Nucl. Med. Bio. 18/6, 589 (1991), („Srivagtava”), melyet teljes egészében a kitanítás részeként kell tekinteni. Különösen előnyös kelátor az 1-izotiocikmato-benzil-3-metil-diotelén-triamin-pentaecetsav („MX-DTPA”), az indirekt jelölésre alkalmazható, különösen előnyös radioaktív izotópok az indium[111] és itrium[90]. „Direkt jelölés” és „direkt jelölési megközelítési mód” alatt azt értjük, hogy a radioaktív izotópot kovalensen közvetlenül (tipikusan egy aminosavon keresztül) az ellenanyaghoz kötjük. Előnyös radioaktív izotópokat ismertet Srivagtava; direkt jelölésre alkalmazható, különösen előnyös radioaktív izotóp a tirozinon keresztül kovalensen kötött jód[131]. Különösen előnyös az indirekt jelölési megközelítési mód alkalmazása.

A találmány szerinti terápiás alkalmazások azon alapulnak, hogy a főemlősök immunrendszere képes a vérben található perifériás B-sejtek gyors pótlására vagy megfiatalítására. Továbbá mivel a főemlősök immunválasza elsősorban a T-sejtek közvetítésével jön létre, amennyiben az immunrendszerből a perifériás B-sejtek hiányoznak, nincs szükség „rendkívüli” óvintézkedésekre (azaz, a beteg izolálására stb.). Ennek eredményeképp, valamint a főemlősök immunrendszerének egyéb finom tulajdonságaiból következően a B-sejtes rendelkezések terápiás megközelítése lehetővé teszi immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok alkalmazásával a vérben található perifériás B-sejtek eltávolítását.

Mivel a vérben található perifériás B-sejteket érintő rendelkezések kezelése a meghatározás alapján feltételezi, hogy hozzá kell férnünk a vérhez, az immunoló-

giailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagokat és a radioaktívan jelölt anti-CD20-ellenanyagokat előnyösen parenterálisan adagoljuk; „parenterális” adagolási módon vénába (intravénásan), izomba, bőr alá, végbélbe, hüvelybe vagy hasüregbe történő adagolást értünk. Ezek közül az intravénás adagolási mód a legelőnyösebb.

Az immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagokat és a radioaktívan jelölt anti-CD20-ellenanyagokat tipikusan szokásos technikák alkalmazásával, egy gyógyászati elfogadható pufferben, például steril fiziológiás sóoldatban, steril pufferolt vízben, propilénlikolban vagy az előzőek kombinációjában stb. állítjuk elő. Parenterálisan adagolható szerek előállítására vonatkozó eljárások leírását tartalmazza a „Pharmaceutical Carriers & Formulations” [Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15. kiadás („Mack Pub. Co.”, Easton, PA (1975)], melyet teljes egészében a kitanítás részeként kell tekinteni.

Bármely adott beteg esetében az immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagoknak az egyedi terápiás hatás létrehozásához szükséges, terápiásan hatékony pontos mennyiségét szakember számára jól ismert standard technikákkal határozhatjuk meg.

Az immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok hatékony dózisa (azaz, a terápiásan hatékony mennyiség) körülbelül 0,001–30 mg/testtömeg-kg közé esik, előnyösebben körülbelül 0,01–25 mg/testtömeg-kg közé esik, legelőnyösebben körülbelül 0,4–20,0 mg/testtömeg-kg közé esik. Egyéb dózisok is alkalmazhatók; a dózist befolyásoló tényezők anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk: a betegség súlyossága, a megelőző kezelési módok, a beteg általános egészségi állapota, egyéb betegségei stb. Szakember hivatott az adott beteg állapotának megítélésére, és a megadott határokon belül eső vagy ha szükséges azon kívül eső alkalmas dózis megállapítására.

Az immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok fenti dózishatárokon belül történő adagolása történhet egyetlen kezelés során vagy sorozatos kezelése során. A kiméra-ellenanyagokra való tekintettel előnyös, ha az adagolás sorozatos kezelése során történik; ez az előnyös megvalósítási mód az ezzel a betegséggel járó kezelési módokon alapul. Bár nem kívánjuk magunkat semmilyen adott elmélethez kötni, megállapíthatjuk, hogy mivel az immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok mind immunológiai aktívak, mind pedig kötődnek CD20-hoz, miután az immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagokat első alkalommal adagoltuk az egyének, megkezdődik a perifériás B-sejtek számának csökkenése; megfigyeléseink szerint a kezelést szolgáló infúzió adagolását követő 24 órán belül a B-sejtek csaknem teljesen eltűntek. Ennek következtében az immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok (vagy radioaktívan jelölt anti-CD20-ellenanyagok) további adagolása(i) a betegnek feltehetően: a) eltávolítja a vérben található megmaradt perifériás B-sejteket; b) megindítja a B-sejtek számának csökkenését a nyirokcsomókban; c) megindítja a B-sejtek számának csökkenését egyéb szöveti forrásokban, például csontvelőben, tumorban stb. Megismé-

teljük, hogy az immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok ismételt adagolása események sorát indítja meg, melyek mindegyikét lényegesnek tekintjük a betegség hatékony kezelése érdekében. Az első „lépést” úgy tekinthetjük, hogy az elsősorban a beteg vérében található perifériás B-sejtek alapos eltávolítására irányul, az azt követő „lépéseket” úgy tekinthetjük, hogy azok elsősorban – vagy párhuzamosan vagy egymást követően – a rendszerből a megmaradt B-sejteknek, a nyirokcsomókból a B-sejteknek, vagy más szövetekből a B-sejteknek az eltávolítására irányulnak.

Valójában, míg egyetlen dózis alkalmazása is hasznos és hatékonyan alkalmazható a betegség kezelésére/kézben tartására, egy előnyös kezelési folyamat több lépésben valósul meg; legelőnyösebben a betegnek egy héten egy alkalommal, körülbelül 2–10 hétig, legelőnyösebben körülbelül 4 hétig, körülbelül 0,4–20 mg/testtömeg-kg immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagot adagolunk.

Radioaktívan jelölt anti-CD20-ellenanyagok alkalmazásával kapcsolatban előnyösnek tartják, ha az ellenanyag nem kiméra; ez az előnyben részesítés a kiméra-ellenanyagoknak az egérellenanyagokkal összehasonlítva lényegesen hosszabb keringési fél életidején alapul (azaz, a hosszabb keringési fél életidő következtében a radioaktív izotóp tovább van jelen a betegben). A radioaktívan jelölt kiméra-ellenanyagok jótékony hatása azonban, az egérellenanyagokhoz viszonyítva a kiméra-ellenanyaggal együtt adagolt alacsonyabb milli-Curie („mCi”)-dózisok alkalmazásával érvényesülhet. Ez a terv lehetővé teszi a terápiás alkalmazhatóság fennmaradása mellett a csontvelő-toxicitás elfogadható szintre való csökkentését.

A találmány szerinti megvalósítási módban különböző radioaktív izotópok alkalmazhatók, szakember hivatott eldönteni, hogy a különböző feltételek mellett melyik radioaktív izotóp alkalmazása a legmegfelelőbb. Célzott immunterápiára alkalmazott, jól ismert radioaktív izotóp például a jód[131]. A jód[131] klinikai alkalmazhatóságát azonban, több faktor korlátozhatja, többek között: nyolcnapos fizikai felezési ideje, a jódzott ellenanyag dehalogéneződése, ami mind a vérben, mind a tumor helyén végbemegy, valamint sugárzási tulajdonságai (például magas gamma-sugárzási összetevője), ami nem optimális a sugárdózisnak a tumor helyére történő lokalizálása szempontjából. Jobb kelátorok megjelenésével lehetővé vált proteinekhez fém kelátorcsoportok kapcsolása, ami lehetővé tette más radioaktív izotópok, mint például indium[111] és itrium[90] alkalmazását. Az itrium[90] radio-immunterápiás alkalmazása több előnnyel jár: az itrium[90] 64 órás felezési ideje elég hosszú ahhoz, hogy a tumorban az ellenanyag felhalmozódhasson, és ellentétben a jód[131]-gyel, az itrium[90] tisztán nagy energiájú béta-sugárzást bocsát ki, bomlását nem kíséri gamma-sugárzás, és hatását 100–1000 sejtméretnek megfelelő szövetben fejti ki. A minimális mennyiségű áthatoló sugárzás lehetővé teszi továbbá az itrium[90]-nel jelölt ellenanyag ambuláns adagolását. Ezenkívül a sejt elöléséhez nincs szükség a jelölt ellenanyagnak sejtbe való bejutására, és az

ionizáló sugárzás helyi kibocsátása elegendő a célzott antigént nem hordozó szomszédos tumorsejtek elpusztítására.

Az itrium[90] nem terápiás célú felhasználásának egyik korlátja a jelentősebb gamma-sugárzás hiánya, ami megnehezíti vele történő radiológiai képalkotást. Ennek a problémának a kiküszöbölésére az itrium[90]-nel jelölt anti-CD20 terápiás dózisának adagolását megelőzően a tumor elhelyezkedésének és viszonylagos méretének meghatározására egy diagnosztikus „képalkotó” radioaktív izotóp, mint például az indium[111] alkalmazható. Az indium[111] különösen előnyös diagnosztikus radioaktív izotópként, mivel: abból körülbelül 1–10 mCi kimutatható toxicitás nélkül biztonságosan adagolható; és a leképezési adatok általánosságban előre jelzik az azt követő itrium[90]-nel jelölt ellenanyag megoszlását. A legtöbb leképezési vizsgálatban 5 mCi indium[111]-nel jelölt ellenanyagot alkalmaznak, mivel ez a dózis biztonságos, és alacsonyabb dózissal összehasonlítva fokozottan hatékony képalkotást tesz lehetővé, optimális a képalkotás az ellenanyag adagolását követő 3–6. napok között. [Lásd például: Murray J. L.: *J. Nuc. Med.* 26, 3328 (1985) és Carraguillo J. A. és munkatársai: *J. Nuc. Med.* 26, 67 (1985)].

Az itrium[90]-nel jelölt anti-CD20-ellenanyagoknak egyszeri kezelés során alkalmazott hatékony dózisa (azaz, terápiásan hatékony mennyisége) körülbelül 5–75 mCi közé, előnyösebben körülbelül 10–40 mCi közé esik. Jód[131]-gyel jelölt anti-CD20-ellenanyagoknak a nem csontvelőben található B-sejtek eltávolítására egyszeri kezelés során alkalmazott hatékony dózisa körülbelül 5–70 mCi, előnyösebben körülbelül 5–40 mCi. Jód[131]-gyel jelölt anti-CD20-ellenanyagoknak az ablatív (a csontvelőben található B-sejtek eltávolítására is elegendő), egyszeri kezelés során alkalmazott hatékony dózisa (azaz, amely autológ csontvelő-átültetést tehet szükségessé), körülbelül 30–600 mCi, előnyösebben körülbelül 50 és kevesebb mint 500 mCi közé esik. A jód[131]-gyel jelölt kiméra anti-CD20-ellenanyagoknak az egérellenanyagokhoz viszonyítva hosszabb keringési felezési idejének köszönhetően a nem csontvelőben található B-sejtek eltávolítására egyszeri kezelés során alkalmazott hatékony dózisa körülbelül 5–40 mCi, előnyösebben kevesebb mint körülbelül 30 mCi. A leképezéshez, például az indium[111]-jelölésből, tipikusan kevesebb mint körülbelül 5 mCi szükséges.

A radioaktívan jelölt anti-CD20-ellenanyagok vonatkozásában az azokkal történő terápia történhet egyszeri kezelés során vagy több kezelés alkalmazásával. A radioaktív izotóp-összetevő következtében előnyösen a kezelést megelőzően a betegek közül, melyeknél a besugárzás következtében esetleg fatális csontvelő-toxicitás léphet fel, perifériás törzssejteket („PSC”) vagy csontvelőt („BM”) kell gyűjtenünk. A csontvelőt és/vagy perifériás törzssejteket szokásos technikákkal gyűjtjük, majd tisztítjuk, és az esetleges visszainfundálásig fagyasztva tároljuk. Előnyös továbbá ha a kezelést megelőzően a betegben egy jelölt diagnosztikus ellenanyag (például indium[111]-gyel jelölt ellenanyag) felhasználásával diagnosztikus dozimetriás vizsgálatot

végzünk abból a célból, hogy megbizonyosodjunk róla, hogy a jelölt terápiás ellenanyag (például ittrium[90]-nel jelölt ellenanyag) nem „koncentrálódik” szükségtelenül valamely normális szervben vagy szövetben.

Kiméra egér/humán ellenanyagokat leírtak már. [Lásd például: Morrison S. L. és munkatársai: PNAS 11, 6851 (1984. november); 173494 számú európai közvéteteli irat; Boulianne G. L. és munkatársai: Nature 312, 642 (1984. december); Neubeiger M. S. és munkatársai: Nature 314, 268 (1985. március); 125023 számú európai közvéteteli irat; Tan és munkatársai: J. Immunol. 135, 8564 (1985. november); Sun L. K. és munkatársai: Hybridoma 5/1, 517 (1986); Sahagan és munkatársai: J. Immunol. 137, 1066 (1986); lásd általánosságban: Muron: Nature 312 597 (1984. december); Dickson: Genetic Engineering News 5/3, (1985. március); Marx: Science 229, 455 (1985. augusztus); valamint Morrison: Science 229, 1202 (1985. szeptember).] Robinson és munkatársai a WO 88/04936 számú PCT közvéteteli iratban olyan kiméra-ellenanyagot írnak le, amely humán konstans régiót és egér variábilis régiót tartalmaz, és a CD20 egy epitópjára specifikus; a Robinson-féle szakirodalmi hivatkozásban a kiméra-ellenanyagnak az egérből származó része a 2H7 jelzésű egér monoklonális ellenanyagból származik (gamma 2b, kappa)]. Míg a szakirodalmi hivatkozásban megjegyzik, hogy a leírt kiméra-ellenanyag B-sejteket érintő rendelkezések kezelésére alkalmazható „első számú jelölt”, ez a kijelentés csupán a szakember számára szolgáló javaslatnak tekinthető, és szakemberen múlik annak eldöntése, hogy a fenti javaslat érvényes-e az adott ellenanyagra, különösen, mivel a szakirodalmi helyen nem található semmiféle adat, ami alátámasztaná a terápiás hatékonyság vonatkozásában tett kijelentést, és különösen, mivel hiányoznak magasabb rendű emlősökre, mint például főemlősökre vagy emberre vonatkozó adatok.

Kiméra-ellenanyagok előállítására szolgáló eljárások szakember számára jól ismertek. A könnyű és nehéz láncokat expresszálhatjuk például külön-külön, például az immunglobulin könnyű láncokat és az immunglobulin nehéz láncokat külön plazmidban. Ezeket aztán tisztíthatjuk és *in vitro* teljes ellenanyagokká állíthatjuk össze; az összeállításra alkalmazható eljárások ismertek. Lásd például: Scharf M.: Harvey Lectures 69, 125 (1974). Ugyancsak leírták a redukált izolált könnyű és nehéz láncokból IgG-ellenanyagok képzéséhez szükséges *in vitro* reakciós paramétereket. Lásd például: Beychok S.: „Cells of Immunglobulin Synthesis”, Academic Press, New York, 69. oldal (1979). A könnyű és nehéz láncokat expresszálhatjuk ugyanazon sejten is, hogy a nehéz és könnyű láncok a sejten belül kapcsolódjanak össze, és képződjön közöttük kötés, hogy végül teljes H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> IgG-ellenanyag keletkezzen. Az ilyen együttes expresszálódást elérhetjük ugyanazon gazdasejten egy azonos plazmid vagy különböző plazmidok alkalmazásával.

Egy további eljárás, amely a találmány szerinti nem humán/humán kiméra anti-CD20-ellenanyagok kifejlesztésére általunk legelőnyösebbnek tartott eljárás, egy

olyan expressziós vektor alkalmazásán alapul, amely *ab initio* humán forrásból származó nehéz és könnyű lánc konstans régiókat kódoló DNS-t tartalmaz. Egy ilyen vektorba nem humán variábilis régiót kódoló DNS-t inszertálhatunk, ily módon különböző anti-CD20-ellenanyagokat állíthatunk elő, vizsgálhatunk át és analizálhatunk különböző sajátságokra (például a kötőspecifitás típusára, epitópkötő régiókra stb.) nézve; majd az előnyös vagy kívánt anti-CD20-ellenanyagok könnyű és nehéz láncának variábilis régióit kódoló cDNS-t a vektorba klónozzhatjuk. Az ilyen típusú vektorokat „tandem kiméraellenanyag-expressziós” („TCAE”) vektoroknak nevezzük. Limfómák terápiás kezelése céljából immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok előállítására alkalmazott legelőnyösebb TCAE-vektornak a TCAE8-vektor bizonyult. A TCAE8 a bejelentő tulajdonában levő, TCAE5,2 nevezetű vektor származéka, az eltérés abban áll, hogy a TCAE5,2-vektorban a domináns szelektálható marker (neomycin foszfortranszferáz, „NEO”) transzlációs iniciációs starthelye egy Kozak-féle konszenzus szekvencia, míg a TCAE8-vektorban ez a szekvencia egy részben módosult Kozak-féle konszenzus szekvencia. A TCAE-vektorok (melyeket „ANEX-vektoroknak” is neveznek) domináns szelektálható markere iniciációs starthelyének proteinexpresszióra kifejtett hatását részletesen a jelen bejelentéssel egyidejűleg benyújtott, függő, szabadalmi bejelentéshez csatolt találmányi leírásban fejtettük ki.

A TCAE8 négy transzkripciós kazettát tartalmaz, ezek tandem módon helyezkednek el, azaz a sorrend: egy variábilis régiót nem tartalmazó humán immunglobulin könnyű lánc; egy variábilis régiót nem tartalmazó humán immunglobulin nehéz lánc; DHFR; és NEO. Mindegyik transzkripciós kazetta tartalmazza saját eukarióta promoterét és poliadenilezési helyét (itt utalunk az 1. ábrára, amely a TCAE8-vektor diagram-ábrázolása). Közelebbről,

1. az immunglobulin nehéz lánc előtt található CMV promoter/enhanszer a könnyű lánc előtt található promoter/enhanszer csonka változata, a -350. pozícióban található NheI hasítási helytől a -16. pozícióban található SstI hasítási helyig [lásd Cell 41, 521 (1985)];

2. a humán immunglobulin könnyű lánc konstans régiót cDNS alapján PCR-reakcióval végzett amplifikációval nyertünk. A TCAE8-vektorban ez a humán immunglobulin kappa könnyű lánc konstans régió [a Kabat-féle számozás szerint: 108–214. aminosavak, Km3-allotípus, lásd Kabat E. A.: „Sequences of proteins of immunological interest” Ngi Publication, 5. kiadás, szerkesztési szám: 91–3242 (1991)] és a humán immunglobulin gamma-1 nehéz lánc konstans régió (a Kabat-féle számozás szerint: 114–478. aminosavak, Gmla, Gmlz allotípusok) voltak. A könnyű láncot normál humán vérből izoláltuk (IDEC Pharmaceuticals Corporation, LaJolla, CA); az abból nyert RNS-ről cDNS-t szintetizáltunk, majd azt PCR-technikával amplifikáltuk (a láncindító oligonukleotidokat *vis a vis* a Kabat-féle konszenzus alapján terveztük). A nehéz láncot olyan RNS alapján előállított cDNS-ről izoláltuk (PCR-technika alkalmazásával), melyet humán IgG1-

vektorral transzfektált sejtekből nyertünk [lásd, Prot. Eng. 3, 531 (1990); pN<sub>γ1</sub> 162]. Az izolált humán IgG1-ben két aminosavat megváltoztattunk, hogy az megfeleljen a Kabat szerinti konszenzus aminosavszekvenciának, azaz: a 225. aminosavat valinról alaninra cseréltük (GTT helyett GCA) és a 287. aminosavat metioninról lizinre változtattuk (ATG helyett AAG);

3. a humán immunglobulin könnyű és nehéz lánc kazetták szintetikus szignálszekvenciákat tartalmaznak az immunglobulinláncok szekretálása céljából;

4. a humán immunglobulin könnyű és nehéz lánc kazetták specifikus DNS-restríktions helyeket tartalmaznak, melyek lehetővé teszik könnyű és nehéz immunglobulin variábilis régiók inszertálását oly módon, hogy az átmenetnél az olvasási fázisok megmaradjanak, és az immunglobulinláncokban normálisan található aminosavak ne változzanak meg;

5. a DHFR-kazetta saját eukarióta promotert (az egér béta-globin fő promotert, „BETA”) és poliadenilezési régiót (a szarvasmarha-növekedési hormon poliadenilezési helyet, „BGH”) tartalmazott; valamint

6. a NEO-kazetta saját eukarióta promotert (BETA) és poliadenilezési régiót (SV40 korai poliadenilezési helyet, „SV”) tartalmazott.

A TCAE8-vektort és a NEO-kazettát illetően, a Kozak-féle régió részben módosult Kozak-féle konszenzus szekvencia, amely 5'-irányban egy ClaI-helyet tartalmazott:

ClaI    -3       +1

GGGAGCTTGG ATCGAT ccTct ATG Gtt  
(A TCAE5,2-vektorban az eltérés a ClaI- és ATG-regiók között található, azaz a szekvencia ccAcc.)

A TCAE8-vektornak (ezen belül a négy transzkripció kazetta pontos összetevőinek) teljes szekvencia-listáját a 2. ábra mutatja (2. azonosító számú szekvencia).

Szakember számára nyilvánvaló, hogy a TCAE-vektorok alkalmazásának előnye, hogy lényegesen lerövidül az immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok előállításához szükséges idő. Nem humán könnyű és nehéz lánc variábilis régiók előállítása és izolálása, majd azoknak a humán könnyű lánc konstans transzkripció kazettába és humán nehéz lánc konstans transzkripció kazettába történő beépítése lehetővé teszi immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok előállítását.

Kiindulásként egér, valamint hibridómatechnológia alkalmazásával a lehető legelőnyösebb CD20-antigénre specifikus nem humán variábilis régiót állítottuk elő. Polimeráz-láncreakciós („PCR”) technikák alkalmazásával az egér könnyű és nehéz variábilis régiókat közvetlenül a TCAE8-vektorba klónoztuk – ez a nem humán variábilis régiók TCAE-vektorba történő klónozásának legelőnyösebb módja. Ez az előnyben részesítés elsősorban a PCR-reakciók hatékonyságán és az inszertálás pontosságán alapul. A fenti feladat elvégzésére azonban más egyenértékű eljárások is rendelkezésre állnak. Például a TCAE8-vektort (vagy egy annak megfelelő vektort) alkalmazhatjuk úgy, hogy először meghatározzuk egy nem humán anti-CD20-ellenanyag va-

riábilis régiójának szekvenciáját, majd a szekvencia részeinek megfelelő oligonukleotidot szintetizálunk, vagy ha szükséges, az egész szekvenciát szintetizáljuk, végül a teljes szintetikus szekvencia részeit a vektor megfelelő helyére inszertáljuk. Szakember számára ismertek a feladat elvégzéséhez szükséges eljárások.

Az általunk legelőnyösebbnek tartott immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagokat olyan TCAE8-vektor alkalmazásával nyertük, amely CD20-antigénnel szembeni monoklonális ellenanyagból származó egér variábilis régiókat tartalmazott; ezt az ellenanyagot (melyet az alábbiakban részletesen ismertettünk), „2B8”-ellenanyagnak neveztük. A 2B8-ból származó, TCAE8-vektorban található variábilis régiók („TCAE8-ba klónozott anti-CD20”) teljes szekvenciáját a 3. ábra ismerteti (2. azonosító számú szekvencia).

A proteinexpresszióra előnyösen emlős eredetű gazdasejtvonalat használunk; szakember hivatott annak eldöntésére, hogy mely gazdasejtvonalakat tartja legmegfelelőbbnek a kívánt géntermék expresszálására. Ilyen sejtvonalak anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk: a DG44 és DUXBII (kínaihörcsögpefefészek-vonalak, DHFR-mínusz), HELA (humán méhnyakkarcinóma), CVI (majomvese-sejtvonal), COS (a CVI SV40-T-antigént tartalmazó származéka), R1610 (kínaihörcsög-fibroblaszt), BALBC/3T3 (egérfibroblaszt), HAK (hörcsögvese-sejtvonal), SP2/O (egérmielóma), P3 × 63-Ag3,653 (egérmielóma), BFA-1c1BPT (szarvasmarha-endototelsejtek), RAJI (humán limfocita) és 293 (humán vese)-sejtvonalak. Gazdasejtvonalak tipikusan hozzáférhetőek a kereskedelembe, az „American Tissue Culture Collection” intézettől vagy közölt szakirodalom alapján.

A gazdasejtvonal előnyösen DG44- („CHO”) vagy SP2/O-sejtvonal. Lásd: Urand G. és munkatársai: „Effect of gamma rays and the dihydrofolate reductase locus: deletions and inversions” Som. Cell & Mol. Gen. 12/6, 555 (1986); valamint Schulman M. és munkatársai: „A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies” Nature 267, 269 (1978). A gazdasejtvonal legelőnyösebben DG44-sejtvonal. A plazmidot a szakember számára ismert bármely technikával a gazdasejtbe juttathatjuk. Ezek anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk: transzfekció (ezen belül elektroforézis és elektroporáció), a sejtek fuzionáltatása burkolt DNS-sel, mikroinjektálás és intakt vírussal történő fertőzés. [Lásd Ridgway A. A. G.: „Mammalian Expression Vectors”, 24.2 fejezet, 470. oldal, Vectors, szerkesztő: Rodriguez and Denhardt, „Butterworths”, Boston, MA (1988).] A plazmidot legelőnyösebben elektroporációval juttathatjuk a gazdasejtbe.

Miután a találmány szerinti megoldást általánosságban ismertettük, a továbbiakban azt konkrét megvalósítási példákon keresztül kívánjuk szemléltetni, anélkül azonban, hogy igényünket az ismertetettkre korlátoznánk. Az alábbi példákon keresztül a következőket kívánjuk ismertetni: radioaktívan jelölt anti-CD20-ellenanyagok („I2B8”-ellenanyagok) alkalmazásával végzett dózislekepezést; radioaktívan jelölt anti-CD20-ellenanyagot („Y2B8”-ellenanyagot); valamint megha-

tározott vektor („TCAE8”-vektor) és egér anti-CD20 monoklonális ellenanyagból („2B8”-ellenanyagból) származó variábilis régiók alkalmazásával előállított immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagokat („C2B8”).

### 1. példa

*Radioaktívan jelölt 2B8 jelzésű anti-CD20-ellenanyag*

A. *Anti-CD20 monoklonális ellenanyagok (egér eredetű ellenanyagok) („2B8”) előállítása*

BALB/c-egereket immunizáltunk ismételt, 3–4 hónapos időtartam során hetente végzett injektálásokkal a humán SB limfoblasztoid sejtvonallal [lásd Adams R. A. és munkatársai: „Direct implantation and serial transplantation of humán acute lymphoblastic leukemia in hamsters, SB–2” Can. Res. 28, 1121 (1986)] ez a sejtvonat ATCC CCL 120 nyilvántartási szám alatt hozzáférhető az „American Tissue Culture Collection” intézettől (Rockville, MD). Ismert CD20-specifikus ellenanyagok gátlása alapján [az alkalmazott anti-CD20-ellenanyagok a Leu16-ellenanyagok (Beckton Dickinson, San Jose, CA, katalógusszám: 7670), és a BI-ellenanyagok (Coulter Corp., Hialeah, FL, katalógusszám: 6602201) voltak], magas anti-CD20-ellenanyagszéklet-titerrel rendelkező egereket azonosítottunk, ezek lépét eltávolítottuk. A lépsejteket SP2/0 egér-mielóma-sejtekkel fuzionáltattuk az Einfeld D. A. és munkatársai által leírt eljárással [EMBO 7, 711 (1988)] (az SP2/0 az ATCC 8006 nyilvántartási számon szerepel).

A CD20-specifitás vizsgálatára radioimmunvizsgálati eljárást alkalmaztunk. Röviden, tisztított BI anti-CD20-ellenanyagokat jódozott mikrorészecskék alkalmazásával – Valentine M. A. és munkatársai szerint –  $^{125}\text{I}$ -dal jelöltünk [J. Biol. Chem. 264, 11282 (1989)]. ( $^{125}\text{I}$  nátrium-jodid, ICN, Irvine, CA, katalógusszám: 28665H). A hibridómákat oly módon vizsgáltuk, hogy mindegyik fúziós rekeszből 0,05 ml tápfolyadékot, 1% BSA-t tartalmazó PBS-ben (pH 7,4) oldott 0,05 ml  $^{125}\text{I}$ -jelölt BI anti-CD20-ellenanyagot (10 ng), valamint 0,5 ml, az előbbivel megegyező összetételű pufferben szuszpendált 100 000 SB-sejtet inkubáltunk együtt. Miután az inkubálást 1 órán át szobahőmérsékleten folytattuk, a sejteket 96 rekeszű mikrotitrálólemezekre összegyűjtöttük (V & P Scientific, San Diego, CA) és alaposan mostuk. Pozitív és negatív kontrollokként jelöletlen BI anti-CD20-ellenanyagokat tartalmazó, valamint gátló ellenanyagot nem tartalmazó duplikátumrekeszeket alkalmaztunk. Az 50%-nál nagyobb gátlást mutató rekeszeket felszaporítottuk és klónoztuk. A legnagyobb fokú gátlást mutató ellenanyagot a „2B8”-elnevezésű klónozott sejtvonalból nyertük.

B. *2B8–MX–DTPA-konjugátum előállítása.*

i) *MX–DTPA*

Karbon-14-jelölt 1-izotiocianato-benzil-3-metil-dietilén-triamin-pentaecetsavat („karbon-14-gyel jelölt MX–DTPA”-t) alkalmaztunk kelátorként a radioaktívan jelölt 2B8 konjugálására. Az MX–DTPA-val végzett műveleteket fémmentes feltételek mellett végeztük, azaz fémmentes reagenseket használtunk, és amennyi-

ben lehetséges, Alconoxszal mosott és Milli-Q-vízzel öblített polipropilén műanyag eszközöket (palackokat, főzőpoharakat, mérőhengereket, pipettákat, pipettahegyeket) használtunk. MX–DTPA-t száraz, szilárd formában dr. Otto Gansow-tól kaptuk (National Institute of Health, Bethesda, MD) és szárítva, 4 °C-on (fénytől védve) tároltuk, törzsoldatot Milli-Q vízben készítettünk 2–5 mmol/l koncentrációban, és azt –70 °C-on tároltuk. MX–DTPA-t egy másik forrásból a Coulter Immunology intézettől szereztünk be (Hialeah, Florida) vízben oldott nátriumsó formájában, és azt –70 °C-on tároltuk.

ii) *2B8 előállítása*

A tisztított 2B8-ellenanyagot úgy készítettük elő az MX–DTPA-val történő konjugáláshoz, hogy az ellenanyagot CENTRICON 30™ centrifugafilterek (30 000 D molekulatömeg-határig áteresztő szűrő, Amicon) alkalmazásával, ismételt puffercserékkel 150 mmol/l NaCl-t tartalmazó fémmentes 50 mmol/l „bicin-NaOff”-ba (pH 8,6) vittük át. Általánosságban a filtert tartalmazó egységbe 50–200 µl proteint (10 mg/ml) tettünk, majd ehhez 2 ml bicinpuffert adtunk. A filtereket 4 °C-on Sorval SS–34 rotorban centrifugáltuk (6000 fordulat/perc, 45 perc). A maradék térfogat körülbelül 50–100 µl volt; ezt a műveletet ugyanazon filter alkalmazásával kétszer ismételtük. A maradékot 1,5 ml térfogatú, csavaros kupakkal ellátott polipropilén-csőbe vittük át, meghatároztuk a proteintartalmat, 10,0 mg/ml koncentrációig hígítottuk, és a felhasználásig 4 °C-on tároltuk; a protein egy részét a fenti eljáráshoz hasonló módon eljárva 150 mmol/l NaCl-ot és 0,05 nátrium-azidot tartalmazó 50 mmol/l nátrium-citrát-pufferbe (pH 5,5) vittük át.

iii) *2B8 konjugálása MX–DTPA-val*

A 2B8-ellenanyagot az MX–DTPA-val polipropilén-csövekben, közömbös hőmérsékleten (szobahőmérsékleten) konjugáltuk. Az MX–DTPA törzsoldatot közvetlenül a felhasználást megelőzően felolvasztottuk. 50–200 ml 10 mg/ml koncentrációjú proteint MX–DTPA-val reagáltattunk 4:1 MX–DTPA:2B8 moláris arány mellett. A reakciót az MX–DTPA törzsoldat hozzáadásával és óvatos keveréssel indítottuk meg; a konjugációs reakciót 1 éjszakán át (14–20 órán át), szobahőmérsékleten hagytuk végbemenni. A nem reagált MX–DTPA-t az IB.ii) pontban a fent leírtak szerint a konjugátumból dialízissal vagy ismételt ultraszűrővel eltávolítottuk, és a proteint 0,05% nátrium-azidot tartalmazó, fémmentes fiziológiás sóoldatba (0,9%) vittük át. A proteinkoncentrációt 10 mg/ml-re állítottuk be, és az oldatot a radioaktív jelölésig polipropilén-csőben 4 °C-on tároltuk.

iv) *A beépült MX–DTPA meghatározása.*

A beépült MX–DTPA-t scintillációs számlálással és a tisztított konjugátummal kapott értékeknek karbon[14]-gyel jelölt MX–DTPA specifikus aktivitásával történő összehasonlításával határoztuk meg. Egyes vizsgálatokban, melyekben radioaktívan nem jelölt MX–DTPA-t használtunk (Coulter Immunology), az MX–DTPA-beépülést oly módon határoztuk meg, hogy a konjugátumot feleslegben alkalmazott, ismert

koncentrációjú és specifikus aktivitású itrium[90] radioaktív hordozóoldattal inkubáltuk együtt.

Ismert koncentrációjú itrium-klorid-törzsoldatot fémmentes 0,05 normál/l HCl-ban állítottunk elő oly módon, hogy ahhoz hordozómentes itrium[90]-et (klorid só formájában) adtunk. Ennek az oldatnak egy mintáját folyadékszintillációs számlálóban analizáltuk, hogy a reagens pontos specifikus aktivitását meghatározzuk. Egy polipropiléncsőbe olyan térfogatú itrium-klorid reagenst tettünk, ami az ellenanyaghoz várhatóan kötődő kelát mólban kifejezett számának háromszorosát tartalmazta (tipikusan 2 mol/mol ellenanyag), majd a pH-t 2 mol/l nárium-acetáttal 4,0–4,5-re állítottuk be. Ezt követően hozzáadtuk a konjugált ellenanyagot, és az elegyet 15–30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. A reakciót 20 mmol/l EDTA hozzáadásával állítottuk le 1 mmol/l végkoncentrációban alkalmazva, majd az oldat pH-ját 2 mol/l nárium-acetáttal körülbelül pH 6-ra állítottuk be.

Ötperces inkubálást követően a teljes térfogatot nagy teljesítményű molekulaszűrő-kromatográfiával tisztítottuk (lásd az alábbiakban). Az eluált proteintartalmú frakciókat összeöntöttük, a proteinkoncentrációt meghatároztuk, és egy mintát radioaktivitásra nézve analizáltunk. A kelátbeépülést az itrium[90]-klorid készítmény specifikus aktivitása és a proteinkoncentráció alapján számítottuk ki.

v) *A 2B8-MX-DTPA immunreaktivitása*

A konjugált 2B8 immunreaktivitását teljes sejt-ELISA-eljárással határoztuk meg. Tenyészetből centrifugálással a log fázis közepén található SB-sejteket gyűjtöttünk össze, majd a sejteket 1×HBSS-pufferrel kétszer mostuk. A sejteket 1–2×HBSS-pufferben 10<sup>6</sup> sejt/ml sejtkoncentrációig hígítottuk, és 96 rekeszű polisztrén mikrotitrálólemezekre mértük ki, egy rekeszhez 50 000–100 000 sejtet adtunk. A lemezeket 2 órán át 40–45 °C-on vákuum alatt szárítottuk, hogy a sejteket a műanyaghoz fixáljuk; a lemezeket a felhasználásig szárazon –20 °C-on tároltuk. A vizsgálati eljárás-hoz a lemezeket közvetlenül a felhasználás előtt szobahőmérsékletre melegítettük, majd 2 órán át 1% BSA-t tartalmazó 1×PBS-sel blokkoltuk (pH 7,2–7,4). A vizsgálati eljárás-hoz a mintákat 1×PBS/1% BSA-pufferben hígítottuk, lemezekre mértük, és azonos összetételű pufferben határhígítással (1:2 léptékben) hígítottuk. Miután a lemezeket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, a lemezeket 1×PBS-sel háromszor mostuk. A rekeszekhez második ellenanyagot (50 µl kecskében termelt anti-gér IgG1-specifikus HRP-konjugátumot) adtunk (1×PBS/1% BSA-pufferben 1:1500 arányban hígítva) és 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A lemezeket 1×PBS-sel négyszer mostuk, majd ABTS-szubsztrát-oldatot (0,01% ATBS-t és 0,001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ot tartalmazó 50 mmol/l nárium-citrátot, pH 4,5) adtunk hozzájuk. A lemezeket 15–30 perces inkubálást követően 405 nm hullámhosszon leolvastuk. A vizsgálati eljárásba a nem specifikus kötődés meghatározására anti-génnegatív HSB-sejteket iktattunk. A konjugátum immunreaktivitását oly módon számítottuk ki, hogy az abszorpciós értékeket a megfelelő hígítási faktorial

szemben ábrázoltuk, és ezt összehasonlítottuk ugyanazon lemezen vizsgált natív ellenanyaggal kapott (100%-os immunreaktivitást képviselő) értékekkel; a titrálási görbe lineáris szakaszán található több értéket összehasonlítottunk, és meghatároztuk az átlagértéket (az adatokat nem tüntettük fel).

vi) *Indium[111]-gyel ielölt 2B8-MX-DTPA („I2B8”) előállítás.*

Az izotóp egy 0,05 mol/l HCl-ban oldott mintáját (0,1–2 mCi/mg ellenanyag) polipropiléncsőbe tettük, és ahhoz körülbelül egytized térfogatú fémmentes 2 mol/l koncentrációjú HCl-ot adtunk. Ötperces inkubálást követően a csőhöz fémmentes 2 mol/l koncentrációjú nárium-acetátot adtunk, hogy az oldat pH-értékét 4,0–4,4-re állítsuk be. Ehhez 0,05% nárium-azidot tartalmazó fiziológiás sóoldatban vagy 50 mmol/l nárium-citrát/150 mmol/l NaCl-oldatban 10,0 mg/ml DTPA-t tartalmazó törzsoldatból körülbelül 0,5 mg 2B8-MX-DTPA-t adtunk, és az oldatot azonnal óvatosan elkevertük. Az oldat pH-ját pH-papírral ellenőriztük, megbizonyosodtunk arról, hogy a pH 4,0–4,5 közé esik, és az elegyet 15–30 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. Végül a reakciót 20 mmol/l EDTA-val, 1 mmol/l végkoncentrációban alkalmazva leállítottuk, majd az oldat pH-ját 2 mol/l nárium-acetáttal körülbelül pH 6,0-ra állítottuk be.

Öt-tíz perces inkubálást követően a komplexet nem képző radioizotópot molekulaszűrő-kromatográfiával el-távolítottuk. HPLC-egységként oldatszállító rendszerrel felszerelt Waters Model-6000 vagy Toso Haas Model TSK-6110 készüléket használtunk, melyek megfelelően Waters-U6K vagy Rheodyne-700 injekciós szelepet tartalmaztak. A kromatográfiás elválasztást gélp-mermeációs oszlop (BioRad SEC-250; 7,5×300 mm vagy annak megfelelő TosoHaas-oszlop) és SEC-250 védőoszlop (7,5×100 mm) alkalmazásával végeztük. A rendszer frakciószedőt (Pharmacia Frac200) és 280 nm szűrővel ellátott UV-monitort (Pharmacia UV-1 modelt) is tartalmazott. A mintákat felvittük az oszlopra, és 1×PBS- (pH 7,4) pufferrel 1,0 ml/perc folyadékáramlási sebesség mellett izokratikusan eluáltuk. Üvegcsővekbe 0,5 ml térfogatú frakciókat gyűjtöttünk, és az azokból vett mintákat gamma-számlálóval analizáltuk. Az alsó és felső „ablakokat” 100 és 500 KeV-ra állítottuk be.

A beépült radioaktivitást oly módon határoztuk meg, hogy az eluált proteincsúccsal kapcsolatos radioaktivitást összegeztük, és ezt a számot az oszlopról eluált összes radioaktivitással osztottuk; ezt az értéket azután százalékban adtuk meg (az adatokat nem tüntettük fel). Egyes esetekben a beépült radioaktivitást gyors vékonyréteg-kromatográfiával („ITLC”-vel) határoztuk meg. A radioaktívan jelölt konjugátumot 1:10 vagy 1:20 arányban 1×PBS-ben vagy 1×PBS/1 mmol/l DTPA-pufferben hígítottuk, majd 1 µl-t egy 1×5 cm ITLC SG papírcsíkra, annak szélétől 1,5 cm távolságra rácseppentettünk. A papírt metanol: víz elegyben (1:1 térfogat%) oldott 10% ammónium-acetát felhasználásával felszálló-kromatográfiának vetettük alá. A csíkot megszárazítottuk, keresztben félbevágtuk, és gamma-számlálóval mind-

egyik darab radioaktivitását meghatároztuk. A csík alsó felén található radioaktivitást (a proteinnel kapcsolt radioaktivitást) a felső és alsó féldarab értékeinek összegzésével kapott össz-radioaktivitás százalékában fejeztük ki (az adatokat nem tüntettük fel).

A specifikus aktivitást a radioaktívan jelölt konjugátumból vett minta radioaktivitásának mérésével határoztuk meg. Ezt az értéket a számláló hatásfokával (tipikusan 75%-kal) korrigáltuk, a konjugátum előzőleg 280 nm-en mért abszorpciója alapján meghatározott proteinkoncentrációhoz viszonyítottuk, és a kapott értéket mCi/mg proteinegységben fejeztük ki.

Egyes kísérletek esetében a 2B8–MX–DTPA-t indium[111]-gyel jelöltük radioaktívan, a fenti eljáráshoz hasonló módon eljárva, azonban HPLC-tisztítást nem alkalmazva, ezt az eljárást „mix and shoot”-eljárásnak neveztük el.

vii) *Ittrium[90]-nel jelölt 2B8–MX–DTPA („Y2B8”) előállítás*

Az ittrium[90]-nel jelölt 2B8–MX–DTPA („Y2B8”) konjugátum előállítására az I2B8 előállításánál leírt eljárást alkalmaztuk, azzal az eltéréssel, hogy nem használtunk 2 mol/l-es HCl-oldatot; valamennyi ittrium[90]-nel jelölt konjugátumot tartalmazó készítményt molekulaszűrő-kromatográfiával tisztítottuk a fent ismertetettek szerint.

C. *Nem humán, az állatokon végzett vizsgálatok*  
i) *A radioaktívan jelölt 2B8–MX–DTPA biológiai megoszlása*

Hat-nyolc hetes BALB/c-egerekben vizsgáltuk az I2B8 biológiai megoszlását a szövetekben. A radioaktívan jelölt konjugátumot a fent leírt „mix and shoot” eljárás alkalmazásával klinikai tisztasági fokú 2B8–MX–DTPA felhasználásával állítottuk elő. A konjugátum specifikus aktivitása 2,3 mCi/mg volt, és a konjugátumot 50 mg/ml HSA-t tartalmazó PBS-ben (pH 7,4) formuláztuk. Az egereket 100 µl (körülbelül 21 mCi) I2B8-ellenanyaggal intravénásan oltottuk, és 0, 24, 48 és 72 óra elteltével három egérből álló csoportokat a nyakcsigolya eltörésével leöltünk. A leölést követően a farkat, szívet, tüdőt, májat, vesét, lépét, izommintát és a combcsontot eltávolítottuk, mostuk és lemértük; ezenkívül vérmintát vettünk analízis céljára. Valamennyi minta radioaktivitását gamma-számlálóval mértük, majd százalékosan meghatároztuk az injektált dózissal egy gramm szövetre eső részét. Az egyes szövetekben található vér által képviselt radioaktivitást nem kíséreltük meg kivonni.

Egy másik eljárás szerint 10 hétig 4 °C-on vagy 30 °C-on inkubált 2B8–MX–DTPA-mintákat indium[111]-gyel jelöltünk radioaktívan, így mindkét készítmény esetében 2,1 mCi/mg specifikus aktivitást értünk el. Ezeket a konjugátumokat a fent leírtak szerint, egerekben a biológiai megoszlás vizsgálatára használtuk fel.

Dozimetriás meghatározás céljára, a 2B8–MX–DTPA-t indium[111]-gyel 2,3 mCi/mg specifikus aktivitás eléréséig radioaktívan jelöltük, és 20 BALB/c-egér mindegyikébe körülbelül 1,1 µCi-t injektáltunk. Ezt követően, 1, 24, 48 és 72 óra elteltével

egyenként öt egérből álló csoportokat leöltünk, azok szerveit eltávolítottuk, és az analízishez előkészítettük. Mintát vettünk a bőrből, izomból és csontból is, és ezeket az analízishez előkészítettük; a 24–72 órás időpontokban vizeletet és székletet is gyűjtöttünk, és azt analizáltuk.

Hasonló eljárás alkalmazásával 2B8–MX–DTPA-t ittrium[90]-nel radioaktívan jelöltünk, és annak biológiai megoszlását BALB/c-egerekben értékeltük egy 72 órás vizsgálati időszak során. HPLC molekulaszűrőses kromatográfiával végzett tisztítást követően egyenként öt egeret tartalmazó négy csoportot intravénásan, körülbelül 1 µCi klinikailag formulázott konjugátummal (specifikus aktivitás: 12,2 mCi/mg) injektáltunk; ezt követően az egyes csoportokba tartozó egereket 1, 24, 48 és 72 óra elteltével leöltük, és azok szerveit és szöveteit a fent leírtak szerint analizáltuk. Az egyes szövetmintákkal kapcsolatos radioaktivitást gamma-szcintillációs számlálóval, a fékezési sugárzás mérésével határoztuk meg. Az aktivitásértékeket ezután az injektált dózis egy gramm szövetre eső részének százalékban kifejezett értékével vagy egy adott szövetre eső részének százalékban kifejezett értékével adtuk meg. Míg a szerveket és egyéb szöveteket a felületen található vér eltávolítása érdekében ismételtelen mostuk, a szerveket nem perfundáltuk. A szervekre vonatkozó aktivitásértékekből tehát a bennük található vér által képviselt aktivitást nem vontuk ki.

ii) *Az I2B8-ellenanyag tumorlokalizációja*

A radioaktívan jelölt 2B8–MX–DTPA lokalizációját Ramos-féle B-sejtes tumort tartalmazó timuszhiányos egerekben határoztuk meg. Hat-nyolc hetes korú, timuszhiányos egereket injektáltunk bőr alá oltva (a bal hátsó oldalon) 0,1 ml, előzőleg timuszhiányos egerekben való növekedéshez adaptált  $1,2 \times 10^7$  Ramos-féle tumorsejtet tartalmazó RPMI–1640 tápfolyadékkal. A tumor körülbelül két hét alatt kifejlődött, és 0,07–1,1 gramm tömeget ért el. Az egereket intravénásan 100 µl indium[111]-gyel jelölt 2B8–MX–DTPA-val (16,7 µCi) oltottuk és 0, 24, 48 és 72 óra elteltével egyenként három egérből álló csoportokat a nyakcsigolya eltörésével leöltünk. A leölést követően a farkat, szívet, tüdőt, májat, vesét, lépét, izommintát, a combcsontot és a tumort eltávolítottuk, mostuk és lemértük; ezenkívül vérmintát vettünk analízis céljára. Valamennyi minta radioaktivitását gamma-számlálóval mértük, majd az injektált dózissal egy gramm szövetre eső részét százalékosan meghatároztuk.

iii) *Biológiai megoszlási és tumorlokalizációs vizsgálatok radioaktívan jelölt 2B8–MX–DTPA-val*

A fent leírt biológiai megoszlást vizsgáló kísérlet szerint [1. példa B.viii) a) pont], konjugált 2B8-ellenanyagot indium[111]-gyel jelöltünk radioaktívan 2,3 mCi/mg specifikus aktivitás eléréséig, és a radioaktívan jelölt anyag biológiai megoszlásának meghatározása céljából 20 BALB/c-egér mindegyikébe körülbelül 1,1 µCi-t injektáltunk. Ezt követően, 1, 24, 48 és 72 óra elteltével egyenként öt egérből álló csoportokat leöltünk, azok szerveit, a bőr, az izom és a csont egy részét eltávolítottuk, és az analízishez előkészítettük. A 24–72 órás időpontok-

ban vizeletet és székletet is gyűjtöttünk és azt analizáltuk. A vérben található radioaktivitás szintje az 1. órában 40,3% (injektált dózis/gramm) volt, ez a 72. órára 18,9%-ra csökkent (az adatokat nem tüntettük fel). A kísérlet során a szív, a vese, az izom és a lép esetében mért értékek 7–9,8% között maradtak. A tüdőkből található radioaktivitás szintje az 1. órában 14,2% volt, és ez a 72. órára 7,6%-ra csökkent; hasonlóképp, a májban az (injektált dózis/gramm) értékek 10,3% és 9,9% voltak. Ezeknek az adatoknak az alapján meghatároztuk a 2B18-ellenanyag esetében az abszorbeált sugárdózis becslését, az alább leírtak szerint.

Az itrium[90]-nel jelölt, 12,2 mCi/mg ellenanyag-specifikus aktivitással rendelkező konjugátum biológiai megoszlását BALB/c-egerekben határoztuk meg. A radioaktivitás beépülése nagyobb volt, mint 90%, és a radioaktívan jelölt ellenanyagot HPLC-eljárással tisztítottuk. A radioaktivitás egyes szervekben való lerakódását 72 órás megfigyelés során meghatároztuk a fő szervekben, a bőrben, a csontban, valamint a vizeletben és székletben, és azt az (injektált dózis/gramm szövet) százalékában fejeztük ki. Az eredmények szerint (az adatokat nem tüntettük fel) a vérben található radioaktivitás szintje az 1. órában mért körülbelül 39,2%-os (injektált dózis/gramm) értékről a 72. órára körülbelül 15,4%-ra esett, a farokkal, a szívvel, a vesével, az izommal és a léppel kapcsolatos radioaktivitás szintje a kísérlet során meglehetősen állandó, azaz 10,2% vagy kevesebb maradt. Lényeges, hogy a csonttal kapcsolatos radioaktivitás értéke az 1. órában 4,4% (injektált dózis/gramm csont) volt, a 72. órában ez az érték 3,2% volt. Összefoglalva, a fenti eredmények arra utalnak, hogy a konjugátumban kevés szabad itrium volt jelen, és ez a kis mennyiségű, szabad, radioaktív fém a kísérlet során felszabadult. Ezeknek az adatoknak az alapján a 2BY8-ellenanyag esetében meghatároztuk az abszorbeált sugárdózis becslését az alább leírtak szerint.

A tumorlokalizációs vizsgálat céljára 2B8–MX–DTPA-t állítottunk elő, és azt indium[111]-gyel radioaktívan jelöltük, 2,7 mCi/mg specifikus aktivitást értünk el. A jelölt konjugátum 100 µl-ét (körülbelül 24 µCi-t) ezután 12 timuszhiányos, Ramos-féle tumort tartalmazó egérbe injektáltuk. A tumor tömege 0,1–1,0 gramm között változott. Az injektálást követően 0., 24., 48. és 72. óra elteltével a szem mögötti véna punkciójával 50 µl vért vettünk, az ereket a nyakcsigolya eltörésével leöltük, a farkat, a szívet, a tüdőket, a májat, a vesét, a lépét, az izommintát, a combcsontot és a tumort eltávolítottuk. A szövetek feldolgozását és lemerését követően valamennyi szövetminta radioaktivitását gamma-számlálóval meghatároztuk, és az értékeket az injektált dózis 1 gramm szövetre eső részének százalékban kifejezett értékével adtuk meg.

Az eredmények azt mutatták, hogy az indium[111]-2B8–MX–DTPA szöveti koncentrációja a kísérlet során folyamatosan nőtt. 72 óra elteltével a tumorban az injektált dózis 13%-a halmozódott fel. Ezzel szemben a vérszintek a kísérlet során a 0. órában mért több mint 30%-ról a 72. órában mérhető 13%-ra csökkentek. Valamennyi egyéb szövet (az izmot kivéve) a kísérlet végén

grammonként az injektált dózis 1,3–6% át tartalmazta; az izomszövet grammonként az injektált dózis körülbelül 13%-át tartalmazta.

#### D. Humán vizsgálatok

5 i) 2B8 és 2B8–MX–DTPA: humán szöveteken végzett immunhisztológiai vizsgálatok

A 2B8 jelzésű egér monoklonális ellenanyag szöveti reaktivitását acetonnal fixált 32 különböző humán szövetből álló sorozat felhasználásával vizsgáltuk. 10 A 2B8-ellenanyag a nagymértékben korlátozott szöveti megoszlást mutató CD20-antigénnel reagál, mely csupán a limfoid szövetek egy alcsoportját képező, ezen belül hematopoetikus (vérképző) eredetű sejteken található meg.

15 A nyirokcsomókban immunreaktivitás volt kimutatható a kortikális érett B-limfociták egy csoportjában, valamint a germinális központ szaporodó sejteiben. Szintén pozitív reaktivitást figyeltünk meg a perifériás vérben, a mandulák B-sejtes területein, a lép fehér pulpájában és a timusz (csecsemőmirigy) medulláris limfocitáinak 40–70%-ában. Ugyancsak pozitív reaktivitást figyeltünk meg a vastagbél falában a „lamina propria” follikulusaiban (a nyálkahártya kötőszövetes rétegében található Peyer-féle plakkokban). Ezenkívül a 2B8-ellenanyaggal pozitív reakciót adtak a különböző szervek kötőszöveti rétegében található elszórt vagy aggregátumot képező limfoid sejtek, például a hólyagban, a mellben, a méhnyakban, a nyelőcsőben, a tüdőben, a fültőmirigyben, a prosztatában, a vékonybélben és a gyomorban található sejtek (az adatokat nem tüntettük fel).

30 Az egyszerű hámszövetek, valamint a rétegződött hám és a különböző szervek hámbélése nem mutatott reaktivitást. Hasonlóképp nem volt reaktivitás megfigyelhető a neuroektodermális sejtekben, például az agyban, a gerincvelőben és a perifériás idegekben. Ugyancsak negatívnak bizonyultak a mesenchyma eredetű elemek, például vázizom- és simaizomszövetek, fibroblasztok, endotel sejtek és a gyulladáshoz kapcsolódó folyamatokban szerepet játszó polimorfonukleáris sejtek (az adatokat nem tüntettük fel).

40 A 2B8–MX–DTPA konjugátum szöveti reaktivitását 16 különböző, acetonnal fixált humán szövetből álló kombináció vizsgálatára alapján értékeltük. Amint azt a megelőzőekben natív ellenanyag alkalmazásával kimutattuk (az adatokat nem tüntettük fel), a 45 2B8–MX–DTPA konjugátum a nagymértékben korlátozott szöveti megoszlást mutató CD20-antigént ismeri fel, amely csupán a limfoid szövetek egy alcsoportját képező sejtekben található meg.

50 A nyirokcsomókban immunreaktivitás volt kimutatható a B-sejtpopulációban. Erős reaktivitást figyeltünk meg a lép fehér pulpájában és a timusz (csecsemőmirigy) medulláris limfocitáiban. Ugyancsak pozitív reaktivitást figyeltünk meg a hólyagban, a szívben, a vastagbélben, a májban, a tüdőkből és a méhben található elszórt limfocitákban, melyet a fenti szövetekben jelen levő gyulladáshoz kapcsolódó sejtek jelenlétének tulajdonítottunk. A natív ellenanyaghoz hasonlóan nem volt reaktivitás kimutatható a neuroektodermális sejtekben vagy a mesenchyma eredetű elemekben (az adatokat nem tüntettük fel).

ii) Az I2B8-ellenanyag (a leképezéshez használt ellenanyag és az Y2B8-ellenanyag (a terápia céljára alkalmazott ellenanyag) klinikai analízise

a) I/II. fázisú klinikai kipróbálási vizsgálat: egyetlen dózis alkalmazásával végzett terápia

Az I2B8-ellenanyaggal végzett (leképezés) és ezt követően az Y2B8-ellenanyag egyetlen terápiás dózisának alkalmazásával végzett I/II. fázisú klinikai analízis folyamatban van. Az egyetlen dózis alkalmazásával történő vizsgálatot az alábbi terv alapján végeztük:

1. perifériás törzssejteket (PSC) vagy csontvelőt (BM) gyűjtünk tisztítással;
2. I2B8-ellenanyaggal leképezést végzünk;
3. terápiás célból Y2B8-ellenanyagot adagolunk (három dózisszint alkalmazásával); és
4. PSC- vagy autológ csontvelő-transzplantációt végzünk (ezt akkor ítélik szükségesnek, ha az össz neutrofil sejtszám három egymást követő napon  $500/\text{mm}^3$  alatt van, vagy a vérlemezkék száma  $20\,000/\text{mm}^3$  alatt van és a csontvelővizsgálat nem mutatja a regeneráció jeleit).

Az alábbi Y2B8-dózisszinteket alkalmazzuk:

Dózisszint	Dózis (mCi)
1.	20
2.	30
3.	40.

A maximális tűrhető dózis („MTD”) megállapítása céljából mindegyik dózisszinttel három beteget kezelünk.

A leképezési (dozimetriás) vizsgálatot az alábbiak szerint végezzük: mindegyik beteg két I2B8-ellenanyag alkalmazásával végzett *in vivo* biológiai megoszlási vizsgálatban vesz részt. Az első vizsgálatban 2 mg I2B8-ellenanyagot (5 mCi) adagolunk intravénás (iv.) infúzióban, 1 óra alatt; 1 héttel később 2B8-ellenanyagot (azaz nem konjugált ellenanyagot) adagolunk intravénásan, ennek során a 250 mg/óra adagolási sebességet nem lépjük túl, ezt követően azonnal 2 mg I2B8 (5 mCi) ellenanyagot adagolunk intravénásan, 1 óra alatt. Mindkét vizsgálatban közvetlenül az I2B8-infúziót követően a betegeket leképezzük, és a leképezést (ha jelöltük)  $t=14-18$  óra,  $t=24$  óra,  $t=72$  óra és (ha jelöltük)  $t=96$  óra időpontokban megismételjük. Meghatározzuk az indium[111] jelölés teljes testre jutó átlagos retenciós idejét; hasonló meghatározást végzünk a felismerhető szervek vagy daganatos léziók („az érdeklődésre számot tartó régiók”) esetében is.

Az érdeklődésre számot tartó régiókat összehasonlítjuk a jelölés teljes testre jutó koncentrációjával; a fenti összehasonlítás alapján standard eljárások alkalmazásával megbecsülhető az Y2B8 lokalizációja és koncentrációja. Amennyiben az Y2B8 becsült kumulatív dózisa nyolcszor nagyobb, mint a becsült, teljes testre jutó dózis, vagy amennyiben a máj becsült kumulatív dózisa 1500 cGy-nál nagyobb, az Y2B8-ellenanyaggal nem végezhető kezelés.

Amennyiben a leképezési vizsgálatok elfogadható eredményt hoztak, a betegnek 0,0–1,0 mg/testtömeg kg 2B8-ellenanyagot adagolunk iv. infúzióban, ennek

során a 250 mg/óra adagolási sebességet nem lépjük túl. Ezt követően Y2B8-ellenanyagot (10, 20 vagy 40 mCi) adagolunk intravénásan, 20 mCi/óra adagolási sebesség mellett.

5 b) I/II. fázisú klinikai kipróbálási vizsgálat: több dózis alkalmazásával végzett terápiás vizsgálat

Az Y2B8-ellenanyaggal végzett I/II. fázisú klinikai analízis folyamatban van. A több dózis alkalmazásával történő vizsgálatot az alábbi terv alapján végezzük:

- 10 1. PSC-t vagy csontvelőt gyűjtünk;
2. I2B8-ellenanyaggal leképezést végzünk;
3. terápiás célból Y2B8-ellenanyagot adagolunk (három dózisszint alkalmazásával) négy dózisban vagy összesen 80 mCi kumulatív dózisban; és
- 15 4. PSC- vagy autológ csontvelő-transzplantációt végzünk (a gyakorló orvos döntése alapján).

Az alábbi Y2B8-dózisszinteket alkalmazzuk:

Dózisszint	Dózis (mCi)
1.	10
2.	15
3.	20.

A maximális tűrhető dózis („MTD”) megállapítása céljából mindegyik dózisszinttel három beteget kezelünk.

25 A leképezési (dozimetriás) vizsgálatokat az alábbiak szerint végezzük. Az első két betegnél meghatározzuk a jelöletlen ellenanyag (azaz a 2B8) alkalmazásához az előnyös leképezési dózist. Az első két betegnek 250 ml fiziológiás sóoldatban, 4 óra alatt, 100 mg jelöletlen 2B8-ellenanyagot adagolunk, majd 0,5 mCi I2B8-ellenanyagot adagolunk – a biológiai megoszlás vizsgálatára  $t=0$ ,  $t=10$  perc,  $t=120$  perc,  $t=24$  óra és  $t=48$  óra időpontokban vérmintát veszünk. A betegeket  $t=2$  óra,  $t=24$  óra és  $t=48$  óra időpontokban több régiós gamma-kamerával végzett képalkotó eljárással pásztázzuk. A lépásztázást követően  $t=48$  óra időpontban a betegeknél a leírtak szerint 250 mg 2B8-ellenanyagot, majd 4,5 mCi I2B8-at adagolunk – majd a leírtak szerint vért veszünk, és pásztázást végzünk. Amennyiben 40 100 mg 2B8 alkalmazása megfelelő leképezést eredményez, a következő két betegnek a leírtak szerint 50 mg 2B8-at, majd 0,5 mCi I2B8-at adagolunk, 48 óra elteltével pedig 100 mg 2B8-at, majd 4,5 mCi I2B8-at adagolunk. Amennyiben 250 mg 2B8 alkalmazása eredményez megfelelő leképezést, a következő két betegnek a leírtak szerint 250 mg 2B8-at, majd 0,5 mCi I2B8-at adagolunk, 48 óra elteltével pedig 500 mg 2B8-at, majd 4,5 mCi I2B8-at adagolunk. A következő két betegnek az optimális leképezést eredményező legkisebb 2B8 ellenanyag-mennyiséggel kezeljük. Optimális a leképezés, ha: (1) az ellenanyag leglassabb eltűnése mellett a legjobb hatékonyságú leképezést értük el; (2) az egyes szervekben történő kompartmentalizáció minimalizálásával a legjobb megoszlást értük el; (3) a lézió vonatkozásában a legjobb szubjektív felbontást értük el (tumor/háttér összehasonlításban).

55 Az első négy betegnél az első Y2B8 terápiás dózist az utolsó I2B8 dózist követően 14 nappal kezdjük; a következő betegek esetében az első Y2B8 terápiás dózist az I2B8 dózist követően 2–7 nappal kezdjük.

A betegeknek az Y2B8-kezelést megelőzően az első négy beteg kivételével a leírtak szerint 2B8-ellenanyagot adagolunk, majd iv. infúzióban, 5–10 perc alatt Y2B8-at adagolunk. A biológiai megoszlás vizsgálatára  $t=0$ ,  $t=10$  perc,  $t=120$  perc,  $t=24$  óra és  $t=48$  óra időpontokban vérmintát veszünk. A betegek ismételt Y2B8-kezelésben részesülnek (az első dózissal megegyező dózist adagolunk) körülbelül minden hatodik-nyolcadik héten a maximális négy dózis eléréséig vagy összesen 80 mCi kumulatív dózis eléréséig. Legelőnyösebben a betegek nem kapnak további dózist, míg a beteg WBC-értéke nagyobb/egyenlő 3000 nem lesz, és a AGC-értéke nagyobb/egyenlő 100 000 nem lesz.

A három dózisszint alkalmazásával végzett vizsgálat befejeztével meghatározzuk az MTD-értéket. A vizsgálatba további betegeket vonunk be, és azok az MTD-értéknek megfelelő dózist kapják.

## 2. példa

*Kiméra anti-CD20-ellenanyagok („C2B8”) előállítása*

*A Kiméra anti-CD20-immunglobulint kódoló DNS expressziós vektorok előállítás*

A 2B8 egér-hibridómasejtekből RNS-t izoláltunk Chomczynski P. és munkatársai szerint: [„Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction”. Anal Biochem. 162, 156 (1987)], és annak alapján cDNS-t állítottunk elő. Az egér-immunglobulin könnyű lánc variábilis régióját kódoló DNS-t cDNS-ből polimeráz-láncreakcióval izoláltuk az 5'-végen az egér könnyű lánc szignálszekvenciákkal és a 3'-végen az egér könnyű lánc J-regiójával homológiát mutató láncindító DNS-oligonukleotidpár alkalmazásával. A következő láncindító oligonukleotid-szekvenciákat alkalmaztuk:

1.  $V_L$ -szensz (3. azonosító számú szekvencia)

5' ATC AC AGATCT CTC ACC ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC TTC 3'

(Az aláhúzott rész egy BglII hasítási helyet jelöl; a felülhúzással jelölt rész a startkodonnak felel meg.)

$V_L$ - antiszensz (4. azonosító számú szekvencia)

5' TGC AGC ATC CGTACG TTT GAT TTC CAG CTT 3'

(Az aláhúzott rész egy BsiWI hasítási helyet jelöl.)

A TCAE8-vektorban található megfelelő BglI és BsiWI hasítási helyeket lásd az 1. és 2. ábrán, az anti-CD20-at tartalmazó TCAE8-vektorban található megfelelő hasítási helyeket lásd a 3. ábrán.

Az így kapott DNS-fragmenseket közvetlenül a TCAE8-vektorba klónoztuk a humán kappa könnyű lánc konstans domén elé, majd szekvenáltuk. Az egér könnyű lánc variábilis régiójának így meghatározott DNS-szekvenciáját a 4. ábra mutatja (5. azonosító számú szekvencia); lásd még a 3. ábrán a 978–1362. nukleotidokat. A 4. ábrán feltüntetettük továbbá, a fenti egér variábilis régió kikövetkeztetett aminosavszekvenciáját, valamint a CDR- és keretregiókat is. A 2B8-ből származó egér könnyű lánc variábilis régió az egér kappa-VI. családba tartozik, lásd: Kabat (fent).

Az egér nehéz lánc variábilis régióját hasonló eljárás szerint izoláltuk, és a humán IgG1 konstans domén elé klónoztuk. Az alábbi láncindító oligonukleotidokat alkalmaztuk:

1.  $V_H$ -szensz (6. azonosító számú szekvencia)

5' GCG GCT CCC ACGCGT GTC CTG TCC CAG 3'

(Az aláhúzott rész egy MluI hasítási helyet jelöl.)

$V_H$ - antiszensz (7. azonosító számú szekvencia)

10 5' GG(G/C) TGT TGT GCTAGC TG(A/C) (A/G)GA GAC (G/A)GT GA 3'

(Az aláhúzott rész egy NheI hasítási helyet jelöl.)

A TCAE8-vektorban található megfelelő MluI és NheI hasítási helyeket lásd az 1. és 2. ábrán, az anti-CD20-at tartalmazó TCAE8 vektorban található megfelelő hasítási helyeket lásd a 3. ábrán. Az egér nehéz lánc variábilis régiójának így meghatározott DNS-szekvenciáját az 5. ábra mutatja (8. azonosító számú szekvencia); lásd még a 3. ábrán a 2401–2820. nukleotidokat. Az 5. ábrán feltüntetettük továbbá a fenti egér variábilis régió kikövetkeztetett aminosavszekvenciáját, valamint a CDR- és keretregiókat is. A 2B8-ből származó egér nehéz lánc variábilis régió az egér VH2B-családba tartozik. Lásd: Kabat (fent).

25 B. *Kiméra anti-CD20-ellenanyagot termelő CHO-és SP2/0-transzfektómák előállítása.*

DG44 kínaihörcsög-petefészek („CHO”)-sejteket hipoxantin- és timidinmentes SSFM-II-tápfolyadékban tenyésztünk (Gibco, Grand Island, NY, Form No. 91–0456PK); az SP2/0 egér-mileómasejteket 5% főtájis borjúszerűmmal és 20 mg/l glutaminnal kiegészített „Dulbecco's Modified Eagles Medium” („DMEM”) tápfolyadékban tenyésztünk (Irvine Scientific, Santa Ana, Ca., katalógusszám: 9024). Négymillió sejtet B9X–600 elektroporációs rendszerrel (BTX, San Diego, CA), 0,4 ml térfogatú eldobható küvetében, CHO-sejtek esetében 25  $\mu$ g, SP2/0-sejtek esetében 50  $\mu$ g előzőleg NotI-enzimmal hasított plazmid-DNS-sel elektroporáltunk. Az alábbi paramétereket alkalmaztuk: a CHO esetében 210 V, az SP2/0 esetében 180 V, mindkét esetben 400 mikrofarad és 13 ohm. Mindegyik elektroporációs elegyet hat 96 rekeszű lemezre oltottuk ki (körülbelül 7000 sejt/rekesz). A lemezeket az elektroporációt követő 2 napon, majd azt követően a kolóniák megjelenéséig még 2–3 napon át G418-at (GENETICIN, Gibco, katalógusszám: 860–1811) tartalmazó tápfolyadékkal „tápláltuk” (a tápfolyadékot lecseréltük), amely a CHO esetében 400  $\mu$ g/ml aktív vegyületet, az SP2/0 esetében 800  $\mu$ g/ml aktív vegyületet tartalmazott (a CHO-tápfolyadék ezenkívül 50  $\mu$ mol/l hipoxantint és 8 mol/l timidint is tartalmazott). A kolóniákról származó felülűszót humán ellenanyagra specifikus ELISA-eljárással kiméra-immunglobulin jelenlétére vizsgáltuk. A legnagyobb mennyiségű immunglobulint termelő kolóniákat felszaporítottuk, methotrexátot (CHO esetében 25 nmol/l, az SP2/0 esetében 5 nmol/l) tartalmazó tápfolyadékban, 96 rekeszű lemezekre oltottuk, és minden második vagy harmadik napon a tápfolyadékot lecseréltük. A felülűszót a fentiek szerint vizsgáltuk, és a legnagyobb mennyiségű immunglobulint

termelő kolóniákat tovább vizsgáltuk. A felülúszóból protein-A affinitásos kromatográfiával kiméra anti-CD20-ellenanyagot tisztítottunk.

A tisztított kiméra anti-CD20-ellenanyagot poliakrilamidgéleken végzett elektroforézissel analizáltuk, és megállapítottuk, hogy az több mint 95%-os tisztaságú. A kiméra-ellenanyag affinitását és specifitását a 2B8-ellenanyag alapján határoztuk meg. A direkt és kompetitív kötődési vizsgálati eljárásokban a 2B8 jelzésű egér anti-CD20 monoklonális ellenanyaggal összehasonlítva a kiméra anti-CD20-ellenanyag számos CD20-pozitív B-sejtvonalon összehasonlítható mértékű affinitást és specifitást mutatott (az adatokat nem tüntettük fel). A kiméra-ellenanyag látszólagos affinitásos állandóját („Kap”) jó<sup>125</sup>-tel radioaktívan jelölt kiméra anti-CD20-ellenanyag direkt kötődése alapján, „Scatchard-plot” analízissel határoztuk meg, és azt összehasonlítottuk jó<sup>125</sup>-tel radioaktívan jelölt 2B8-ellenanyag affinitásával. A CHO-sejtekben termelt kiméra anti-CD20-ellenanyagok Kap-értéke  $5,2 \times 10^{-9}$ , az SP2/0-sejtekben termelt ellenanyagoké  $7,4 \times 10^{-9}$  volt. A 2B8-ellenanyagok becsült Kap-értéke  $3,5 \times 10^{-9}$  volt. Direkt kompetitív radioimmun-vizsgálati eljárással, a 2B8-ellenanyagokkal való hatékony kompetitív képesség alapján igazoltuk a kiméra anti-CD20-ellenanyagok specifitását és az immunreaktivitás megtartottságát. A 2B8-ellenanyaggal lényegében azonos mennyiségű kiméra anti-CD20-ellenanyagra volt szükség ahhoz, hogy a B-sejteken található CD20-antigénekhez való kötődést 50%-ban gátoljuk (az adatokat nem tüntettük fel), azaz az anti-CD20-ellenanyagok gátló aktivitásában minimális veszteség volt megfigyelhető, feltehetően a kiméra-képzés következtében.

A 2B. példa eredményei szerint többek között, a TCAE8-vektorok alkalmazásával CHO- és SP2/0-transzfectómákban kiméra anti-CD20-ellenanyagokat állítottunk elő, és ezek a kiméra-ellenanyagok a 2B8 jelzésű egér anti-CD20 monoklonális ellenanyaggal lényegében megegyező specifitással és kötődési képességgel rendelkeztek.

C. *Kiméra anti-CD20-ellenanyagok immunológiai aktivitásának meghatározása*

i) *Humán C1q-analízis*

CHO- és SP2/0-sejtvonalakban előállított kiméra anti-CD20-ellenanyagok humán C1q-hoz való kötődését „flow citometriás” vizsgálati eljárásban értékeltük fluoreszcenciával jelölt C1q felhasználásával (a C1q-t a Quideltől szereztük be, Mira Mesa, Ca., termékszám: A400; a FITC-jelölt anyagot a Sigma szállította, St. Louis MO, termékszám: F-7250, FITC). A C1q-jelölés az alábbi eljárás szerint végeztük: „Selected Methods In Cellular Immunology”, 292. oldal, szerkesztő: Michell & Shiigi, „W. H. Freeman & Co.”, San Francisco, CA., (1980). Az analitikai eredményeket egy Beckton Dickinson FACScan™ „flow citométerrel” határoztuk meg (a fluoreszcenciát 515–545 nm hullámhossztartományban mértük). Egyenlő mennyiségű kiméra anti-CD20-ellenanyagot, humán IgG1 K-mielóma-proteint (Binding Site, San Diego, Ca., termékszám: BP078) vagy 2B8-ellenanyagot inkubáltunk azonos szá-

mú CD-20-pozitív SB-sejt jelenlétében, majd a nem kötődött ellenanyagok eltávolítása céljából FACS-pufferrel (PBS-ben oldott 2% BSA, pH 7,4, valamint 0,02% nátrium-azid) mosást végeztünk, ezután a sejteket FITC-jelölt C1q-val inkubáltuk. Miután az inkubálást 30–60 percig folytattuk, a sejteket ismét mostuk. A három különböző feltétel mellett kapott sejteket, valamint kontrollként a FITC-jelölt C1q-t FACScan™ készülékkel analizáltuk a gyártó utasításai szerint. Az eredményeket a 6. ábra mutatja.

Amint azt a 6. ábra mutatja, csak a kiméra anti-CD20-ellenanyagok alkalmazása esetén volt megfigyelhető a fluoreszcencia jelentős emelkedése; azaz csak a kötődött kiméra anti-CD20-ellenanyagokat tartalmazó SB-sejtek voltak C1q-pozitívak, míg az egyéb feltételek mellett inkubált sejtek a kontrollal megegyező min-tát mutattak.

ii) *Komplementfüggő sejtlízis*

Kiméra anti-CD20-ellenanyagokat analizáltunk humán szérum (komplement forrás) jelenlétében limfóma sejtvonalakat lizáló képességre nézve. CD20-pozitív SB-sejteket <sup>51</sup>Cr-mal jelöltünk oly módon, hogy 100  $\mu$ Ci <sup>51</sup>Cr-ot elegyítettünk  $1 \times 10^6$  SB-sejttel 1 órán át 37 °C-on; ezután a jelölt SB-sejteket azonos mennyiségű humán komplement és azonos mennyiségű (0–50  $\mu$ g/ml) kiméra anti-CD20-ellenanyag vagy 2B8-ellenanyag jelenlétében inkubáltuk 4 órán át 37 °C-on [lásd Brunner K. T. és munkatársai: „Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on <sup>51</sup>Cr-fabeled allogeneic target cells *in vitro*.” *Immunology* 14, 181 (1968)]. Az eredményeket a 7. ábrán mutatjuk be.

A 7. ábra eredményei azt mutatják többek között, hogy a kiméra anti-CD20-ellenanyagok a fenti feltételek mellett szignifikáns (49%-os) lizálódást hoztak létre.

iii) *Vizsgálati eljárás ellenanyagfüggő sejtcitotoxicitást kiváltó hatás kimutatására*

Ebben a vizsgálatban CD20-pozitív sejteket (SB-sejteket) és CD20-negatív sejteket [HSB T-sejtes leukémia-sejtvonalat, lásd Adams, Richard: „Formal Discussion”, *Can. Res.* 27, 2479 (1967), ATCC nyilvántartási szám: ATCC CCL 120.1] használtunk; mindkettőt <sup>51</sup>Cr-mal jelöltük. Az analízist Brunner K. T. és munkatársai eljárása szerint végeztük [„Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on <sup>51</sup>Cr-fabeled allogeneic target cells *in vitro*; inhibition by isoantibody and drugs.” *Immunology* 14, 181 (1968)]; 37 °C-on, 4 óráig végzett inkubálást követően a CD20-pozitív SB-célsejtek (<sup>51</sup>Cr-jelölt sejtek) jelentős mértékű kiméra anti-CD20-ellenanyagfüggő, sejt által közvetített lizálódását figyeltük meg, és ez a hatás mind a CHO-, mind az SP2/0-sejtekben termelt ellenanyagok esetében kimutatható volt (effektorsejteként humán perifériás limfocitákat alkalmaztunk; az effektorsejt: célsejt arány 100:1 volt). 3,9  $\mu$ g/ml koncentráció mellett hatékony célsejtlizálódást kaptunk. Ezzel szemben, azonos feltételek mellett, a 2B8 jelzésű egér anti-CD20 monoklonális ellenanyagok statisztikailag nem szignifáns hatást eredményeztek, és a CD20-negatív HSB-sejtek nem lizálódtak. Az eredményeket a 8. ábrán összegeztük.

A 2. példa eredményei többek között azt mutatják, hogy az 1. példa szerinti kiméra anti-CD20-ellenanyagok immunológiailag aktívak.

### 3. példa

*A B-sejtek számának csökkentése in vivo, kiméra anti-CD20-ellenanyagok alkalmazásával*

#### A. Nem humán emlősön végzett vizsgálat

Nem humán emlősökön három különböző vizsgálatot végeztünk. A könnyebb követhetőség kedvéért, ezeket „kiméra anti-CD20-ellenanyag: CHO & SP2/0”; „kiméra anti-CD20-ellenanyag: CHO”; és „nagy dózisú kiméra anti-CD20-ellenanyag” vizsgálatoknak neveztük. Az alábbi feltételeket alkalmaztuk:

Kiméra anti-CD20-ellenanyag: CHO- & SP2/0-vizsgálat.

Hat cynomolgus majmot (White Sands Research Center, Alamogordo, NM), melyek testtömege 4,5–7 kg közé esett egyenként két majmot tartalmazó három csoportra osztottunk. Mindegyik csoportba tartozó két majom az immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok ugyanazon dózist kapta. Valamennyi csoportban, az egyik majom CHO-transzfectómában előállított tisztított ellenanyagot kapott; a másik SP2/0-transzfectómában előállított ellenanyagot kapott. A három csoport négy (4) egymást követő nap során mindennap 0,1 mg/kg; 0,4 mg/kg és 1,6 mg/kg ellenanyag dózist kapott. A immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagokat steril fiziológiás sóoldatban elegyítve, intravénás infúzióban adagoltuk; mindegyik infundálást megelőzően vérmintát vettünk. További vérmintákat vettünk, az utolsó injektálást követően 24 órával (t=0) és ezután az 1., 3., 7., 14. és 28. napokon; vérmintákat vettünk továbbá hetente a vizsgálat befejezéséig, azaz a 90. napig.

Mindegyik állatból körülbelül 5 ml teljes vért 2000 fordulat/perc mellett 5 percig centrifugáltunk. Az oldható kiméra anti-CD20-ellenanyagszint analízise céljából eltávolítottuk a plazmát. Az üledéket (amely perifériás vérből származó leukocitákat és vörösvérsejteket tartalmazott), főtális borjúsérumban szuszpendáltuk a fluoreszcenciával jelölt ellenanyaggal végzett analízis céljára [lásd „Fluorescent Antibody Labeling of Lymphoid Cell Population”, lásd az alábbiakban].

Kiméra anti-CD20-ellenanyag: CHO-vizsgálat.

Hat cynomolgus majmot (White Sands), melyek testtömege 4–6 kg közé esett, egyenként két majmot tartalmazó három csoportra osztottunk. Valamennyi majmot CHO-transzfectómában előállított immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyaggal injektáltuk (steril fiziológiás sóoldatban). A három csoportot az alábbiak szerint különítettük el: az 1. alcsoport tagjait négy (4) napon át, naponta 0,01 mg/kg ellenanyaggal injektáltuk intravénásan; a 2. alcsoport tagjait négy (4) napon át, naponta 0,4 mg/kg ellenanyaggal injektáltuk intravénásan; a 3. alcsoport tagjai egyetlen, 6,4 mg/kg intravénás ellenanyag-injekciót kaptak. Mindhárom csoport esetében vérmintát vettünk a kezelés kezdetén; továbbá a fent leírtak szerint vérmintákat vettünk az utolsó injektálást követően a t=0., 1., 3., 7., 14. és 28.

napokon, ezeket a mintákat fluoreszcenciával jelölt ellenanyaggal végzett analízisben használtuk fel (lásd „Fluorescent Antibody Labeling”, lásd az alábbiakban). A perifériás B-sejtek mennyiségének meghatározásán felül nyirokcsomó-biopsziát vettünk az utolsó injektálást követő 7., 14. és 28. napokon, és a limfocitapopulációk „flow citometriás” mennyiségi meghatározása céljából különálló sejteket tartalmazó készítményt festettünk.

5 Nagy dózisú kiméra anti-CD20-ellenanyag-vizsgálat.

Két cynomolgus majmot (White Sand) infundáltunk (fiziológiás sóoldatban) 16,8 mg/kg CHO-transzfectómából származó immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyaggal 4 egymást követő héten, hetente. A kezelés befejeztekor mindkét állatból anesztéziában csontvelőt távolítottunk el; ezenkívül nyirokcsomó-biopsziát is vettünk. Mindkét típusú szövetet a B-limfociták jelenlétének „flow citometriás” meghatározására Leu16-tal festettük Ling N. R. és munkatársai által leírt eljárás szerint [„B-cell and plasma cell antigens.” Leukocyte Typing III White Cell Differentiations Antigens, 302. oldal, szerkesztő: A. J. McMichael, „Oxford University Press”, Oxford UK, (1987)].

25 Limfoid sejtpopuláció festése fluoreszcenciellenanyaggal.

A plazma eltávolítását követően a leukocitákat „Hanks Balanced Salt Solution” („HBSS”)-pufferrel kétszer mostuk, és a plazmával megegyező térfogatú főtális borjúsérumban szuszpendáltuk (melyet 56 °C-on, 30 percig inaktiváltunk). Hat (6) 15 ml térfogatú kúpos centrifugacső mindegyikébe 0,1 ml sejt-készítményt tettünk. Három csőhöz a CD2 (AMAC, Westbrook, ME) és a CD20 (Becton Dickinson) humán limfocita felszíni markereket, valamint humán IgM-re (Binding Site, San Diego, CA) specifikus, fluoreszcenciával jelölt monoklonális ellenanyagot adtunk a T- és B-limfocitapopuláció meghatározása céljából. Egy megelőző vizsgálatban, valamennyi reagens pozitívnak bizonyult a megfelelő majom-limfocitaantigénnel szemben. A negyedik csőben phycoerythrinrel (AMAC) konjugált, kecskében termelt poliklonális antihumán IgG alkalmazásával a majom B-sejtek felszínén található CD20-antigénhez kötődött kiméra anti-CD20-ellenanyagokat határoztuk meg. Ezt a reagenst majom-Ig-Sepharose-oszlopon előabszorbeáltuk, hogy a majom-Ig-vel való keresztreakciót megakadályozzuk, és így lehetővé tegyük a sejtekhez kötődött kiméra anti-CD20-ellenanyagok specifikus kimutatását és mennyiségi meghatározását. Az ötödik cső anti-IgM-et és antihumán-IgG-reagenst is tartalmazott a B-sejtpopuláció kettős festése céljából. A hatodik minta az autofluoreszcencia meghatározására szolgált, ezért nem tartalmazott reagenst. A sejteket 30 percig fluoreszcens ellenanyag jelenlétében inkubáltuk, mostuk, 0,5 ml fixálópufferrel fixáltuk (0,15 mol/l NaCl, 1% paraformaldehid, pH 7,4) és „Becton Dickinson FACScan™” készülékkel analizáltuk. A limfocitapopulációkat először jelölés nélküli leukocitákkal azonosítottuk, az előreszórt fényt a jobbra szórt fényel szemben ábrázoló szórásdiagram alapján. Ezután az összes limfocitapopulációt izo-

láttuk minden egyéb esemény kiszűrése (*gating out*) útján. Az azt követő fluoreszcenciamérések csupán megszűrt, limfocitaspecifikus eseményeket tükröztek.

A perifériás vérben található B-limfociták számának csökkentése.

A CHO- és SP2/0-sejtekben előállított ellenanyagok *in vivo* B-sejtszámcsökkentő hatékonyságát tekintve nem találtunk figyelemre méltó különbséget, bár a CHO-transzfectómából származó kiméra anti-CD20-ellenanyagok 1,6 mg/kg dózisszintjével és 6,4 mg/kg dózisszintjével, valamint az SP2/0-sejtekben előállított ellenanyag 0,4 mg/kg dózisszintjével injektált majmokban a 7. nappal kezdődően enyhe B-sejtszámnövekedést észleltünk. A „kiméra anti-CD20-ellenanyag: CHO- & SP2/0”-vizsgálat eredményeit a 9A., B. és C. ábrák mutatják, a 9A. ábra a 0,4 mg/kg dózisszintre vonatkozik; a 9B. ábra az 1,6 mg/kg dózisszintre vonatkozik; a 9C. ábra a 6,4 mg/kg dózisszint hatását szemlélteti.

Amint az a 9. ábrán nyilvánvaló, a perifériás B-sejtek száma a terápiás kezelést követően mind a négy vizsgált dózistartomány esetében drámai módon (>95%-kal) csökkent, ez a szint az infúziót követő 7. napig fennmaradt; ezt követően megkezdődött a B-sejtek számának helyreállása, és ennek kezdete független volt az alkalmazott dózisszinttől.

A „kiméra anti-CD20-ellenanyag: CHO”-vizsgálatban 4 napon át, naponta adott injekciókban 10-szer kisebb ellenanyag dózis-koncentrációkat (0,01 mg/kg) alkalmaztunk (összesen 0,04 mg/kg mennyiséget). A vizsgálat eredményeit a 10. ábra mutatja. Ez a dózis mind az anti-felszíni-IgM, mind a Leu16-ellenanyag alapján meghatározva a perifériás vérben található B-sejtpopulációt a normális szint körülbelül 50%-ára csökkentette. Az eredmények azt mutatják továbbá, hogy az immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok a fenti dóziskoncentrációban és a fenti ideig nem humán emlősöknek adagolva nem telítették a B-limfocitapopulációt található CD20-antigéneket; a terápiás kezelés első 3 napján ellenanyaggal fedett B-limfocitákat tudtunk a vérmintákban kimutatni. A 7. napra azonban az ellenanyaggal fedett sejtek nem voltak kimutathatóak.

Az 1. táblázatban összegeztük az immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagok egyszeri és többszöri dózisának a perifériás vérben található sejtpopulációkra kifejtett hatását; egyszeri dózis alkalmazásánál 6,4 mg/kg ellenanyagot; többszöri dózis alkalmazásánál négy (4) egymást követő nap során napi 0,4 mg/kg ellenanyagot adagoltunk (az eredmények a fent leírt majmkísérletből származtak).

#### 1. táblázat

A perifériás vérben található sejtpopuláció főemlősökön végzett C2B8-ellenanyag-vizsgálat során.

Majom	Dózis	Nap	CD2	Antihumán-IgG
A.	0,4 mg/kg (4 dózis)	vérvétel a kezelés előtt	81,5	-
		0		
		7	86,5	0,2
		21	85,5	0,2
		28	93,3	-
B.	0,4 mg/kg (4 dózis)	vérvétel a kezelés előtt	81,7	-
		0		
		7	94,6	0,1
		21	92,2	0,1
		28	84,9	-
C.	6,4 mg/kg (1 dózis)	vérvétel a kezelés előtt	77,7	0,0
		7		
		21	85,7	0,1
		28	86,7	-
			76,7	-
D.	6,4 mg/kg (1 dózis)	kezelés a vérvétel előtt	85,7	0,1
		7		
		21	94,7	0,1
		28	85,2	-
			85,9	-

1. táblázat (folytatás)

Majom	Antihumán IgG+Antihumán IgM*	Leu16	B-sejtszámcsökkenés (%-ban)
A.	–	9,4	0
	0,3	0,0	97
	0,1	1,2	99
	–	2,1	78
	–	4,1	66
B.	–	14,8	0
	0,2	0,1	99
	0,1	0,1	99
	–	6,9	53
	–	8,7	41
C.	0,2	17,0	0
	0,1	0,0	99
	–	14,7	15
	–	8,1	62
D.	0,1	14,4	0
	0,2	0,0	99
	–	9,2	46
	–	6,7	53

\* Kettős festődést mutató populáció, amely a kiméra anti-CD20-ellenanyagokkal fedett B-sejtek nagyságrendjét jelöli.

Az 1. táblázatban összegzett adatok szerint, az ellenanyag-felesleg jelenlétében a perifériás vérben található B-sejtek száma gyorsan és hatékonyan csökkent, tekintet nélkül arra, hogy egyszeri vagy többszöri dózist alkalmaztunk. A csökkenés megfigyelhető volt továbbá az utolsó injektálást követően legalább hét (7) napig, a 21. napon részleges B-sejtszámjavulást figyeltük meg.

A 2. táblázatban az immunológiai aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagoknak az 1. táblázat szerinti kezelési terv alkalmazása mellett (0,4 mg/kg 4 napon át; vagy 6,4 mg/kg 1 dózisban) a nyirokcsomók sejtpopulációira kifejtett hatását összegeztük; az értékeket (két majomban) normális nyirokcsomókban (a kontrollmajmok hónalji és lágyéki nyirokcsomójában) és normál csontvelőben kapott eredményekkel hasonlítottuk össze.

2. táblázat

Nyirokcsomókban található sejtpopulációk

Majom	Dózis	Nap	CD2	Antihumán-IgM
A.	0,4 mg/kg (4 dózis)	7	66,9	–
		14	76,9	19,6
		28	61,6	19,7
B.	0,4 mg/kg (4 dózis)	7	59,4	–
		14	83,2	9,9
		28	84,1	15,7

25

30

35

40

45

50

Majom	Dózis	Nap	CD2	Antihumán-IgM
C.	6,4 mg/kg (1 dózis)	7	75,5	–
		14	74,1	17,9
		28	66,9	23,1
D.	6,4 mg/kg (1 dózis)	7	83,8	–
		14	74,1	17,9
		28	84,1	12,8

2. táblázat (folytatás)

Majom	Antihumán-IgG+ Antihumán-IgM*	Leu16	B-sejtszám- csökkenés (%-ban)
A.	7,4	40,1	1
	0,8	22,6	44
	–	26,0	36
B.	29,9	52,2	0
	0,7	14,5	64
	–	14,6	64
C.	22,3	35,2	13
	1,1	23,9	41
	–	21,4	47
D.	12,5	19,7	51
	0,2	8,7	78
	–	12,9	68

2. táblázat (folytatás)

	CD2	Antihumán IgG+ Antihumán IgM*	Antihumán-IgM	Leu16	B-sejtszámcsökkenés (%-ban)
1. kontroll: normál nyirokcsomók					
hónalji	55,4	25,0	–	41,4	nem határozható meg
lágycéki	52,1	31,2	–	39,5	
normál csontvelő					
2. kontroll	65,3	19,0	–	11,4	nem határozható meg
3. kontroll	29,8	28,0	–	16,6	

A 2. táblázat eredményei szerint, a B-limfociták száma mindkét kezelési terv alkalmazása esetén hatékonyan csökkent. A 2. táblázatból leolvasható továbbá, hogy a nem humán főemlősökben a nyirokszövetekben található B-sejtek immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyagokkal való teljes telítődését nem sikerült elérni; továbbá a kezelést követően hét (7) nappal ellenanyaggal fedett sejteket tudtunk kimutatni, majd a 14 napon a nyirokcsomókban található B-sejtek számának jelentős csökkenését figyeltük meg.

A fenti adatok alapján a fent említett „egyszeri nagy dózisú kiméra anti-CD20-ellenanyag alkalmazásával végzett vizsgálatot” elsősorban farmakológiai/toxikológiai meghatározás céljából végeztük. Azaz, ezt a vizsgálatot abból a célból végeztük, hogy a kiméra-ellenanyag adagolásával járó bármely toxikus hatást kimutassunk, valamint a perifériás nyirokcsomókban és csontvelőben a B-sejtszámcsökkentés hatékonyságát kimutassuk. Továbbá mivel a 2. táblázat adatai szerint a vizsgálatban a nyirokcsomókban található B-sejtek nagy része a kezelést követő 7–14. nap között tűnt el, hatékonyabb eredménnyel járhat egy olyan kezelési terv, mely szerint az adagolás hetente történik. A 3. táblázatban az „egyszeri nagy dózisú kiméra anti-CD20-ellenanyag alkalmazásával végzett vizsgálat” eredményeit összegeztük.

15  
20  
25

3. táblázat

A nyirokcsomókban és csontvelőben található sejtpopulációk

Limfocitapopulációk (%)					
Majom	CD2	CD20 <sup>a</sup>	mIgM+anti-2CB8 <sup>b</sup>	C2B8 <sup>c</sup>	nap
<i>Lágycéki nyirokcsomó</i>					
E.	90,0	5,3	4,8	6,5	22
F.	91,0	6,3	5,6	6,3	22
G.	89,9	5,0	3,7	5,8	36
H.	85,4	12,3	1,7	1,8	36
<i>Csontvelő</i>					
E.	46,7	4,3	2,6	2,8	22
F.	41,8	3,0	2,1	2,2	22
G.	35,3	0,8	1,4	1,4	36
H.	25,6	4,4	4,3	4,4	36

<sup>a</sup> Leu16-tal festődő populáció.

<sup>b</sup> Kettős festődést adó populáció, felszíni IgM-pozitív és kiméra-ellenanyaggal fedett sejtek.

<sup>c</sup> A kiméra-ellenanyaggal festődő teljes populációt, ezen belül a kettős festődést adó, felszíni IgM-pozitív sejteket és egyszerű festődést adó (felszíni IgM-negatív) sejteket képviseli.

<sup>d</sup> Az utolsó 16,8 mg/kg dózis injektálását követő napok.

A kezelés befejezését követő 22. napon értékelt mindkét állat kevesebb mint 5% B-sejtet tartalmazott, összehasonlítva a kontrollnyirokcsomókban talált 40%-kal (lásd fent, a 2. táblázatot). Hasonló módon, a kiméra anti-CD20-ellenanyaggal kezelt állatok csontvelőjében a CD20-pozitív sejtek szintje kevesebb volt, mint 3%, összehasonlításképp, ez az érték a normál állatokban 11–15% volt (lásd fent, a 2. táblázatot). A kezelés

55  
60

befejezését követő 36. napon értékelt állatok közül az egyik állat (H) nyirokcsomójában körülbelül 12% B-sejtet, a csontvelőben 4,4% B-sejtet találtunk, míg a másik (G) nyirokcsomójában körülbelül 5% B-sejtet, a csontvelőben 0,8% B-sejtet találtunk – az adatok szignifikáns B-sejtszámcsökkenésre utalnak.

A 3A. példa eredményei többek között azt mutatják, hogy immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ell-

ellenanyagok alacsony dózisa főemlősökben hosszú távon csökkenti a perifériás vérben található B-sejtek számát. Az adatok arra utalnak továbbá, hogy az ellenanyag nagy dózisainak ismételt adagolása a perifériás nyirokcsomókban és a csontvelőben a B-sejtpopuláció szignifikáns csökkenését okozta. A vizsgálati állapotok folyamatos követése azt mutatta, hogy még a perifériás B-limfociták számának a kezelés első hetében történő súlyos csökkenése esetében sem volt egészségkárosító hatás megfigyelhető. Ezenkívül, mivel megfigyelhető volt a B-sejtpopuláció helyreállása, azt a következtetést vontuk le, hogy ezeknek a főemlősöknek a pluripotens törzssejtjeit a kezelés nem károsította.

#### B. A C2B8-ellenanyag klinikai analízise

i) I/II. fázisú klinikai kipurálási vizsgálat: egyetlen dózis alkalmazásával végzett terápia

I/II. fázisú klinikai kipurálási vizsgálat során 15, szövettanilag igazolt, relapsusban levő B-sejtes limfómában szenvedő beteget kezeltünk C2B8-ellenanyaggal. Egy dózisonövelő vizsgálatban valamennyi beteg egyetlen C2B8-ellenanyag dózist kapott; egy-egy dózist három beteg kapott, az alábbi dóziseket alkalmaztuk: 10 mg/m<sup>2</sup>; 50 mg/m<sup>2</sup>; 100 mg/m<sup>2</sup>; 200 mg/m<sup>2</sup> és 500 mg/m<sup>2</sup>. A kezelés intravénás infúzióval történt egy 0,22 µm áteresztőképességű sorba kötött szűrőn keresztül, a C2B8-ellenanyagot fiziológiás sóoldatban hígítottuk 250 ml végtérfogóban vagy 1 mg/ml maximális koncentráció eléréséig. Az első órában az adagolás sebessége 50 ml/óra volt; amennyiben toxicitást nem lépett fel, az adagolás sebességét maximálisan 200 ml/óra sebességre növeltük.

A toxicitást (melyet a klinikus állapított meg) az alábbiak szerint osztályoztuk: „semmilyen toxikus hatás”, „láz”, „mértékelt toxikus hatás” (két betegben) és „súlyos toxikus hatás” (egy betegben); a terápiás kezelés valamennyi betegnél befejeződött. Analizáltuk a perifériás vérben található limfocitákat, hogy meghatározzuk többek között, a C2B8-ellenanyagnak a T-sejtekre és B-sejtekre kifejtett hatását. Valamennyi beteg esetében a C2B8-infúziót követően a perifériás vérben található B-limfociták száma következetesen csökkent, és a csökkenés több mint 2 hétig fennmaradt.

Az egyik beteg (amely 100 mg/m<sup>2</sup> C2B8-ellenanyag dózist kapott) a C2B8-kezelésre részlegesen reagált (azaz több mint 4 hétig, valamennyi mérhető indikátorlézió merőleges átmérő szorzatai összegének több mint 50%-os csökkenését figyeltük meg, mely időszak alatt új lézió nem jelent meg, és a meglévő léziók mérete nem növekedett); legalább még egy beteg (amely 50 mg/m<sup>2</sup> C2B8-ellenanyag dózist kapott) a C2B8-kezelésre kismértékben reagált (azaz, valamennyi mérhető indikátorlézió két leghosszabb merőleges átmérője szorzatai összegének kevesebb mint 50%-os, de legalább 25%-os csökkenését figyeltük meg). A hatékonyabb szemléltetés kedvéért, a perifériás vérben található limfociták eredményeit a 14. ábrán összegeztük; a részlegesen reagáló betegre vonatkozó adatokat a 14A. ábra, a kismértékben reagáló betegre vonatkozó adatokat a 14B. ábra mutatja. A 14. ábrán az alábbi jelöléseket alkalmaztuk: ■ = limfociták;

□ = CD3-pozitív sejtek (T-sejtek); ▲ = CD20<sup>+</sup>-sejtek; ● = CD19<sup>+</sup>-sejtek; ○ = kappa; Δ = lambda; és ◆ = C2B8. Amint azt láttuk, a CD20<sup>-</sup>, CD19<sup>-</sup>, Kappa és Lambda B-sejtmarkerek több mint 2 hétig csökkenést mutattak; kezdetben a T-sejtszám enyhén csökkent, ez viszonylag rövid időn belül körülbelül az alapszintre tért vissza.

ii) C2B8-ellenanyag I/II. fázisú klinikai kipurálási vizsgálata: többszörös dózis alkalmazásával végzett terápiás vizsgálat

Erre a vizsgálatra nagymértékben előrehaladott, szövettanilag igazolt B-sejtes limfómában szenvedő betegek alkalmasak, a vizsgálat két részre oszlik: az I. fázisban növekvő dózis hatását vizsgáljuk, hogy a dózist korlátozó toxicitást jellemezzük, és a biológiai aktív tűrhető dózisszintet meghatározzuk; 3-3 beteget tartalmazó csoportok hetente, intravénás infúzióban C2B8-ellenanyagot kapnak, összesen négy (4) infúzió során. A három szint esetében az alábbi kumulatív dóziseket alkalmazzuk: 500 mg/m<sup>2</sup> (125 mg/m<sup>2</sup>/infúzió); 1000 mg/m<sup>2</sup> (250 mg/m<sup>2</sup>/infúzió); 1500 mg/m<sup>2</sup> (375 mg/m<sup>2</sup>/infúzió). A biológiai aktív tűrhető dózisszint alatt azt a legalacsonyabb dózist értjük és határozzuk meg, amely tűrhető toxicitással jár és megfelelő aktivitással rendelkezik; a II. fázisban további betegek kapják a biológiai aktív tűrhető dózist, a hangsúly ezúttal a négy C2B8-dózis aktivitásának meghatározására helyeződik.

#### 4. példa

C2B8 és Y2B8 alkalmazásával végzett kombinációs terápia

C2B8 és Y2B8 alkalmazásával kombinációs terápiát végeztünk egérxenograft-modellben (nőstény, körülbelül 10 hetes korú nu/nu egerekben) B-sejtes limfoblasztoma (Ramos-féle tumorsejtek) felhasználásával. Összehasonlítás céljából további egereket C2B8-ellenanyaggal vagy Y2B8-ellenanyaggal kezeltünk.

Ramos-féle tumorsejteket (ATCC, CRL 1596) 10% borjúszerűmmal és glutaminnal kiegészített RPMI-1640 tápfolyadékot tartalmazó tenyésztetben tartottunk fenn 37 °C-on, és 5% CO<sub>2</sub> mellett. 9, körülbelül 7-10 hetes korú nőstény „nude”-egérben tumort hoztunk létre oly módon, hogy a bőr alá 1,7 × 10<sup>6</sup> Ramos-féle sejtet injektáltunk 0,10 ml térfogatban (HBSS), 25 g (25 „gauge” szabvány méretű) tüvel ellátott 1 ml térfogatú fecskendővel. Valamennyi állatot réteges áramlású steril fülkében („laminar flow hood”) kezeltünk, és valamennyi ketrecet, almot, táplálékot és vizet autoklávoztunk. A tumorsejteket úgy passzáltuk, hogy a tumort kivágtuk, azt egy 40 mesh-es szitán átnyomtuk; a sejteket 1 × HBSS-pufferrel (50 ml) végzett centrifugálással (1300 fordulat/perc) kétszer mostuk, 1 × HBSS-pufferben 10<sup>6</sup> sejt/ml sejtsűrűségben szuszpendáltuk, és felhasználásig -70 °C-on tároltuk.

A kísérleti feltételek céljára több fagyasztott sejtkészítményt felolvasztottunk, a sejteket centrifugálással (1300 fordulat/perc) ülepítettük és 1 × HBSS-pufferrel kétszer mostuk. Ezt követően a sejteket körülbelül 2,0 × 10<sup>6</sup> sejt/ml sejtsűrűségben szuszpendáltuk. Körül-

belül 9–12 egeret injektáltunk (a bőr alá) 0,10 ml sejt-szuszpenzióval, 25-g. méretű tüvel ellátott 1 ml térfogatú fecskendővel; az injektálást az állatok bal oldalán, körülbelül a középső régióban végeztük. A tumor körülbelül 2 hét alatt kifejlődött. A tumorokat kivágtuk és a fent leírtak szerint feldolgoztuk. A vizsgált egereket a fent leírtak szerint 0,10 ml HBSS-pufferben szuszpendált  $1,67 \times 10^6$  sejttel injektáltuk.

A dózismeghatározást célzó előzetes kísérletek alapján úgy határoztunk, hogy a vizsgálatban 200 mg C2B8-ellenanyagot és 100  $\mu$ Ci Y2B8-ellenanyagot alkalmazunk. 90 (körülbelül 10 hetes korú) nőtény nu/nu egeret injektáltunk a tumorsejtekkel. Körülbelül 10 nap múlva 24 egeret négy vizsgálati csoportra osztottunk (egy csoport 6 egeret tartalmazott), a felosztást megkíséreltük oly módon végezni, hogy a tumorok méretének megoszlása valamennyi csoportban összehasonlítható legyen (az átlagos tumorméret, melyet a tumor hosszúságának és szélességének szorzata alapján számítottunk ki, körülbelül 80 mm<sup>2</sup> volt). Az alábbi csoportokat az alábbiak szerint, 25-g. tüvel felszerelt 100  $\mu$ l Hamilton-fecskendővel a farokvénába adott injekcióval kezeltük:

- A. szokásos fiziológiás sóoldat;
- B. Y2B8 (100  $\mu$ Ci);
- C. C2B8 (200  $\mu$ g); és
- D. Y2B8 (100  $\mu$ Ci) + C2B8 (200  $\mu$ g).

A C2B8-ellenanyaggal kezelt csoportok az első injekciót követően 7 nappal egy második C2B8-injekciót kaptak (200  $\mu$ g/egér). A tumorok méretét 2-3 naponként tolmérővel mértük.

A kezelésnél alkalmazott anyagokat az alábbi eljárások szerint állítottuk elő:

#### A. Y2B8-ellenanyag előállítása

Az itrium[90]-kloridot (6  $\mu$ Ci) egy polipropilén-csőbe tettük és fémmentes 2 mol/l koncentrációjú nátrium-acetáttal a pH-t 4,1–4,4-re állítottuk be. Az előzőekhez 2B8–MX–DTPA-t adtunk (0,3 mg fiziológiás sóoldatban; a 2B8–MX–DTPA előállítását lásd fent), és vortexeléssel óvatosan kevertük. Miután az elegyet 15 percig inkubáltuk, a reakciót  $0,05 \times$  térfogat 20 mmol/l EDTA és  $0,05 \times$  térfogat 2 mol/l nátrium-acetát hozzáadásával leállítottuk. A radioaktív koncentrációt oly módon határoztuk meg, hogy a reakcióelegyből 5,0  $\mu$ l-t 2,5 ml térfogatú, 75 mg/ml HSA-t és 1 mmol/l DTPA-t tartalmazó  $1 \times$  PBS-pufferben („formulázópufferben”) hígítottunk; a számlálást úgy végeztük, hogy 20 ml Ecolume™ szcintillációs koktéllhoz 10,0  $\mu$ l mintát adtunk. A reaktív elegy maradékát 3 ml formulázópufferhez adtuk, szűrővel sterilizáltuk, és felhasználásig 2–8 °C-on tároltuk. A specifikus aktivitást (amely az injektáláskor 14  $\mu$ Ci/mg volt), a radioaktív koncentráció és a reakcióelegyhez adott ellenanyag mennyisége alapján számított proteinkoncentráció alapján számítottuk ki. A proteinnel kapcsolt radioaktivitást gyors vékonyréteg-kromatográfiás eljárással határoztuk meg. A radioaktivitás 95%-a épült be. Az Y2B8-ellenanyagot közvetlenül a felhasználást megelőzően formulázópufferben hígítottuk, és szűrővel sterilizáltuk (a végső radioaktív koncentráció 1,0  $\mu$ Ci/ml volt).

#### B. A C2B8-ellenanyag előállítása

A C2B8-ellenanyagokat a fent leírtak szerint állítottuk elő. A C2B8-ellenanyagot fiziológiás sóoldatban, 5,0 mg/ml koncentrációban steril reagensként készítettük el. Az injektálást megelőzően a C2B8-ellenanyagot fiziológiás sóoldatban 2,0 mg/ml koncentrációig hígítottuk, és szűrővel sterilizáltuk.

#### C. Eredmények

A kezelést követően a tumor méretét a tumor hosszúságának és szélességének szorzataként adtuk meg, a méréseket az ábrákon jelölt időpontokban végeztük: 11. ábra (Y2B8 vagy fiziológiás sóoldat); 12. ábra (C2B8 vagy fiziológiás sóoldat); és 13. ábra (Y2B8+C2B8 vagy fiziológiás sóoldat). Meghatároztuk a standard hibát is.

Amint azt a 13. ábra mutatja, az Y2B8- és C2B8-ellenanyagok kombinációja az Y2B8- vagy C2B8-ellenanyagok hatásával összemérhető tumorölő hatást eredményezett.

#### 5. példa

##### Alternatív terápiás stratégiák

A megelőző példák alapján nyilvánvaló, hogy egyéb terápiás stratégiák is lehetségesek. Egy ilyen stratégia szerint C2B8 terápiás dózisának alkalmazását követően körülbelül 1 héttel 2B8 és radioaktívan jelölt 2B8 (például Y2B8) kombinációját; vagy 2B8, C2B8 és például Y2B8 kombinációját; vagy C2B8 és például Y2B8 kombinációját alkalmazzuk. Egy további stratégia szerint radioaktívan jelölt C2B8-ellenanyagot alkalmazunk – a fenti stratégia a C2B8-ellenanyag immunológiailag aktív része, valamint a radioaktív jelölés kombinációja által nyújtott előnyöket használja ki. Előnyösen alkalmazott radioaktív jelölőanyag az itrium[90], tekintetbe véve a C2B8 hosszabb keringési felezési idejét, szemben a 2B8 jelzésű egérellenanyagéval. Egy másik előnyös stratégia szerint a C2B8-ellenanyag B-sejtszámcsökkentő képessége és a radioaktív jelölésből származó előnyök alapján a betegeket C2B8-ellenanyaggal kezeljük (egyetlen vagy több dózis alkalmazásával), hogy a legtöbb, vagy valamennyi perifériás B-sejt eltűnjön. Ezt radioaktívan jelölt 2B8 alkalmazása követi; a perifériás B-sejtszám csökkenésének következtében a radioaktívan jelölt 2B8-ellenanyag jobb eséllyel éri el a célzott tumorsejteket. Előnyösen I[131] jelölt 2B8-at alkalmazhatunk, tekintetbe véve a szakirodalomban közöltek szerint a fenti jelölőanyaggal kapott eredményeket (lásd Kaminski). Egy másik előnyös stratégiában először radioaktívan jelölt 2B8-ellenanyagot (vagy C2B8-ellenanyagot) alkalmazunk, hogy a tumor permeabilitását növeljük, majd C2B8-ellenanyaggal egy vagy több kezelést végzünk; ennek a stratégiának az a célja, hogy növeljük annak az esélyét, hogy a C2B8-ellenanyag a tumor tömegének felszínére és belsejébe is eljusson. Egy további stratégia szerint kemoterápiás szert alkalmazunk C2B8-ellenanyaggal kombinálva. Ezek a stratégiák úgynevezett „szakaszos” kezeléseket foglalnak magukban, azaz a kemoterápiás szerrel történő kezelést C2B8-kezelés követi, majd a fenti eljárás ismétlődik. Lehetséges az is, hogy először egy vagy több C2B8-dózissal vég-

zünk kezelést, majd kemoterápiás kezelés következik. Előnyösen alkalmazott kemoterápiás szerek, anélkül, hogy igényünket az alábbiakra korlátoznánk, a ciklofoszfamid, doxorubicin, vinkrisztin és prednizolon. [Lásd Armitage J. O. és munkatársai: *Cancer* 50, 1695 (1982), mely szakirodalmi hivatkozást teljes egészében a kitanítás részeként kell tekinteni.]

Az előzőekben ismertetett alternatív terápiás stratégiák a szemléltetést szolgálták, anélkül azonban, hogy igényünket a felsoroltakra korlátoznánk.

#### 6. példa

*Információ a letétbe helyezett mikroorganizmusról és hibridómáról*

Az anti-CD20-ellenanyagot kódoló gént tartalmazó TC AE8-plazmidot (melyet a letétbe helyezés céljából *E. coli*-ba transzformáltunk), a „Budapesti Szerződés a Mikroorganizmusok Szabadalmi Eljárás Céljából Történnő Letétbe Helyezésének Nemzetközi Elismeréséről” („Budapesti Szerződés”) rendelkezéseinek értelmében az „American Type Culture Collection” (ATCC) intézetben helyeztük letétbe (12301 Parklawn Drive, Rock-

ville, Maryland, 20852). A mikroorganizmust az ATCC 1992. november 9-én megvizsgálta és arról megállapította, hogy az adott időpontban élő mikroorganizmus. Az ATCC intézet a mikroorganizmust az alábbi deponálási számon helyezte letétbe: ATCC 69119 (TC AE8-plazmidba klónozott anti-CD20). A 2B8-hibridómát a „Budapesti Szerződés” értelmében 1993. június 22-én helyeztük letétbe az ATCC intézetben. A tenyészet életképességét 1993. június 25-én igazolták, és az ATCC ezt a hibridómát az alábbi ATCC deponálási számon helyezte letétbe: HB 11388.

#### SZEKVENCIALISTA

AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADATAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 8540 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLOGIÁJA: cirkuláris

MOLEKULATÍPUS: cDNS

HIPOTETIKUS: nem

ANTISZENZ: nem

#### AZ 1. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG	60
AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC	120
GGAGAATGGG CGGA ACTGGG CGGAGTTAGG GCGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT	180
ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG	240
GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGA CTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT	300
GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAATTCCCCT	360
AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC	420
GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG	480
ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA	540
TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA	600
AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGCCAGTAC	660
ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC	720
ATGGTGATGC GGT TTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA	780
TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG	840
GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA	900
CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC	960
CATCACAGAT CTCTCACCAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG	1020
CTCCCAGGTG CACGATGTGA TGGTACCAAG GTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA	1080

HU 219 264 B

TCTGTCTTCA	TCTTCCCGCC	ATCTGATGAG	CAGTTGAAAT	CTGGAAGTGC	CTCTGTTGTG	1140
TGCCTGCTGA	ATAACTTCTA	TCCCAGAGAG	GCCAAAGTAC	AGTGGAAGGT	GGATAACGCC	1200
CTCCAATCGG	GTAACCTCCA	GGAGAGTGTC	ACAGAGCAGG	ACAGCAAGGA	CAGCACCTAC	1260
AGCCTCAGCA	GCACCCTGAC	GCTGAGCAA	GCAGACTACG	AGAAACACAA	AGTCTACGCC	1320
TGCGAAGTCA	CCCATCAGGG	CCTGAGCTCG	CCCGTCACAA	AGAGCTTCAA	CAGGGGAGAG	1380
TGTTGAATTC	AGATCCGTTA	ACGGTTACCA	ACTACCTAGA	CTGGATTTCG	GACAACATGC	1440
GGCCGTGATA	TCTACGTATG	ATCAGCCTCG	ACTGTGCCTT	CTAGTTGCCA	GCCATCTGTT	1500
GTTTGCCCC	CCCCCGTGCC	TTCCTTGACC	CTGGAAGGTG	CCACTCCCAC	TGTCCTTCC	1560
TAATAAAATG	AGGAAATTGC	ATCGCATTGT	CTGAGTAGGT	GTCATTCTAT	TCTGGGGGGT	1620
GGGGTGGGGC	AGGACAGCAA	GGGGGAGGAT	TGGGAAGACA	ATAGCAGGCA	TGCTGGGGAT	1680
GCGGTGGGCT	CTATGGAACC	AGCTGGGGCT	CGACAGCTAT	GCCAAGTACG	CCCCCTATTG	1740
ACGTCAATGA	CGGTAAATGG	CCCGCCTGGC	ATTATGCCCA	GTACATGACC	TTATGGGACT	1800
TTCCTACTTG	GCAGTACATC	TACGTATTAG	TCATCGCTAT	TACCATGGTG	ATGCGGTTTT	1860
GGCAGTACAT	CAATGGGCGT	GGATAGCGGT	TTGACTCACG	GGGATTTCCA	AGTCTCCACC	1920
CCATTGACGT	CAATGGGAGT	TTGTTTTGGC	ACCAAATCA	ACGGGACTTT	CCAAAATGTC	1980
GTAACAACCTC	CGCCCCATTG	ACGCAAATGG	GCGGTAGGCG	TGTACGGTGG	GAGGTCTATA	2040
TAAGCAGAGC	TGGGTACGTC	CTCACATTCA	GTGATCAGCA	CTGAACACAG	ACCCGTCGAC	2100
ATGGGTTGGA	GCCTCATCTT	GCTCTTCCTT	GTCGCTGTTG	CTACGCGTGT	CGCTAGCACC	2160
AAGGGCCCCAT	CGGTCTTCCC	CCTGGCACCC	TCCTCCAAGA	GCACCTCTGG	GGGCACAGCG	2220
GCCCTGGGCT	GCCTGGTCAA	GGACTACTTC	CCCGAACCGG	TGACGGTGTC	GTGGAECTCA	2280
GGCGCCCTGA	CCAGCGGCGT	GCACACCTTC	CCGGCTGTCC	TACAGTCCTC	AGGACTCTAC	2340
TCCCTCAGCA	GCGTGGTGAC	CGTGCCCTCC	AGCAGCTTGG	GCACCCAGAC	CTACATCTGC	2400
AACGTGAATC	ACAAGCCCAG	CAACACCAAG	GTGGACAAGA	AAGCAGAGCC	CAAATCTTGT	2460
GACAAAACCTC	ACACATGCCC	ACCGTGCCCA	GCACCTGAAC	TCCTGGGGGG	ACCGTCAGTC	2520
TTCCTCTTCC	CCCCAAAACC	CAAGGACACC	CTCATGATCT	CCCGGACCCC	TGAGGTCACA	2580
TGCGTGGTGG	TGGACGTGAG	CCACGAAGAC	CCTGAGGTCA	AGTTCAACTG	GTACGTGGAC	2640
GGCGTGGAGG	TGCATAATGC	CAAGACAAAG	CCGCGGGAGG	AGCAGTACAA	CAGCACGTAC	2700
CGTGTGGTCA	GCGTCCTCAC	CGTCCTGCAC	CAGGACTGGC	TGAATGGCAA	GGAGTACAAG	2760
TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC	CCTCCCAGCC	CCCATCGAGA	AAACCATCTC	CAAAGCCAAA	2820
GGGCAGCCCC	GAGAACCACA	GGTGTACACC	CTGCCCCCAT	CCCGGGATGA	GCTGACCAAG	2880

AACCAGGTCA	GCCTGACCTG	CCTGGTCAAA	GGCTTCTATC	CCAGCGACAT	CGCCGTGGAG	2940
TGGGAGAGCA	ATGGGCACCC	GGAGAACAAC	TACAAGACCA	CGCCTCCCGT	GCTGGACTCC	3000
GACGGCTCCT	TCTTCCTCTA	CAGCAAGCTC	ACCGTGGACA	AGAGCAGGTG	GCAGCAGGGG	3060
AACGTCTTCT	CATGCTCCGT	GATGCATGAG	GCTCTGCACA	ACCACTACAC	GCAGAAGAGC	3120
CTCTCCCTGT	CTCCGGGTAA	ATGAGGATCC	GTTAACGGTT	ACCAACTACC	TAGACTGGAT	3180
TCGTGACAAC	ATGCGGCCGT	GATATCTACG	TATGATCAGC	CTCGACTGTG	CCTTCTAGTT	3240
GCCAGCCATC	TGTTGTTTGC	CCCTCCCCCG	TGCCTTCCTT	GACCCTGGAA	GGTGCCACTC	3300
CCACTGTCCT	TTCCTAATAA	AATGAGGAAA	TTGCATCGCA	TTGTCTGAGT	AGGTGTCATT	3360
CTATTCTGGG	GGGTGGGGTG	GGGCAGGACA	GCAAGGGGGA	GGATTGGGAA	GACAATACCA	3420
GGCATGCTGG	GGATGCGGTG	GGCTCTATGG	AACCAGCTGG	GGCTCGACAG	CGCTGGATCT	3480
CCCGATCCCC	AGCTTTGCTT	CTCAATTTCT	TATTTGCATA	ATGAGAAAAA	AAGGAAAATT	3540
AATTTTAACA	CCAATTCAGT	AGTTGATTGA	GCAAATGCGT	TGCCAAAAAG	GATGCTTTAG	3600
AGACAGTGTT	CTCTGCACAG	ATAAGGACAA	ACATTATTCA	GAGGGAGTAC	CCAGAGCTGA	3660
GACTCCTAAG	CCAGTGAGTG	GCACAGCATT	CTAGGGAGAA	ATATGCTTGT	CATCACCGAA	3720
GCCTGATTCC	GTAGAGCCAC	ACCTTGGTAA	GGGCCAATCT	GCTCACACAG	GATAGAGAGG	3780
GCAGGAGCCA	GGGCAGAGCA	TATAAGGTGA	GGTAGGATCA	GTTGCTCCTC	ACATTTGCTT	3840
CTGACATAGT	TGTGTTGGGA	GCTTGGATAG	CTTGGACAGC	TCAGGGCTGC	GATTTCCGGC	3900
CAAACCTGAC	GGCAATCCTA	GCGTGAAGGC	TGGTAGGATT	TTATCCCCGC	TGCCATCATG	3960
GTTGACCAT	TGAACTGCAT	CGTCGCCGTG	TCCCAAATA	TGGGGATTGG	CAAGAACGGA	4020
GACCTACCCT	GGCCTCCGCT	CAGGAACGAG	TTCAAGTACT	TCCAAAGAAT	GACCACAACC	4080
TCTTCAGTGG	AAGGTAAACA	GAATCTGGTG	ATTATGGGTA	GGAAAACCTG	GTTCTCCATT	4140
CCTGAGAAGA	ATCGACCTTT	AAAGGACAGA	ATTAATATAG	TTCTCAGTAG	AGAACTCAAA	4200
GAACCACCAC	GAGGAGCTCA	TTTCTTGCC	AAAAGTTTGG	ATGATGCCTT	AAGACTTATT	4260
GAACAACCGG	AATTGGCAAG	TAAAGTAGAC	ATGGTTTGG	TAGTCGGAGG	CAGTTCTGTT	4320
TACCAGGAAG	CCATGAATCA	ACCAGGCCAC	CTTAGACTCT	TTGTGACAAG	GATCATGCAG	4380
GAATTTGAAA	GTGACACGTT	TTTCCCAGAA	ATTGATTTGG	GGAAATATAA	ACTTCTCCCA	4440
GAATACCCAG	GCGTCCTCTC	TGAGGTCCAG	GAGGAAAAAG	GCATCAAGTA	TAAGTTTGAA	4500
GTCTACGAGA	AGAAAGACTA	ACAGGAAGAT	GCTTTCAAGT	TCTCTGCTCC	CCTCCTAAAG	4560
CTATGCATTT	TTATAAGACC	ATGGGACTTT	TGCTGGCTTT	AGATCAGCCT	CGACTGTGCC	4620
TTCTAGTTGC	CAGCCATCTG	TTGTTTGCCC	CTCCCCCGTG	CCTTCCTTGA	CCCTGGAAGG	4680

TGCCACTCCC	ACTGTCCTTT	CCTAATAAAA	TGAGGAAATT	GCATCGCATT	GTCTGAGTAG	4740
GTGTCATTCT	ATTCTGGGGG	GTGGGGTGGG	GCAGGACAGC	AAGGGGGAGG	ATTGGGAAGA	4800
CAATAGCAGG	CATGCTGGGG	ATGCGGTGGG	CTCTATGGAA	CCAGCTGGGG	CTCGAGCTAC	4860
TAGCTTTGCT	TCTCAATTTC	TTATTTGCAT	AATGAGAAAA	AAAGGAAAAT	TAATTTTAAC	4920
ACCAATTCAG	TAGTTGATTG	AGCAAATGCG	TTGCCAAAAA	GGATGCTTTA	GAGACAGTGT	4980
TCTCTGCACA	GATAAGGACA	AACATTATTC	AGAGGGAGTA	CCCAGAGCTG	AGACTCCTAA	5040
GCCAGTGAGT	GGCACAGCAT	TCTAGGGAGA	AATATGCTTG	TCATCACCGA	AGCCTGATTC	5100
CGTAGAGCCA	CACCTTGGA	AGGGCCAATC	TGCTCACACA	GGATAGAGAG	GGCAGGAGCC	5160
AGGGCAGAGC	ATATAAGGTG	AGGTAGGATC	AGTTGCTCCT	CACATTTGCT	TCTGACATAG	5220
TTGTGTTGGG	AGCTTGATC	GATCCTCTAT	GGTTGAACAA	GATGGATTGC	ACGCAGGTTT	5280
TCCGGCCGCT	TGCGTGGAGA	GGCTATTCGG	CTATGACTGG	GCACAACACA	CAATCGGCTG	5340
CTCTGATGCC	GCCGTGTTCC	GGCTGTCAGC	GCAGGGGCGC	CCGGTTCTTT	TTGTCAAGAC	5400
CGACCTGTCC	GGTGCCCTGA	ATGAACTGCA	GGACGAGGCA	GCGCGGCTAT	CGTGGCTGGC	5460
CACGACGGGC	GTTCCCTGCG	CAGCTGTGCT	CGACGTTGTC	ACTGAAGCGG	GAAGGGACTG	5520
GCTGCTATTG	GGCGAAGTGC	CGGGGCAGGA	TCTCCTGTGA	TCTCACCTTG	CTCCTGCCGA	5580
GAAAGTATCC	ATCATGGCTG	ATGCAATGCG	GCGGCTGCAT	ACGCTTGATC	CGGCTACCTG	5640
CCCATTGAC	CACCAAGCGA	AACATCCCAT	CGAGCGAGCA	CGTACTCGGA	TGGAAGCCGG	5700
TCTTGTCCAT	CAGGATGATC	TGGACGAAGA	GCATCAGGGG	CTCGCGCCAG	CCGAAGTGT	5760
CGCCAGGCTC	AAGGCGCGCA	TGCCCCACGG	CGAGGATCTC	GTCGTGACCC	ATGGCGATGC	5820
CTGCTTGCCG	AATATCATGG	TGGAAAATGG	CCGCTTTTCT	GGATTCATCG	ACTGTGGCCG	5880
GCTGGGTGTG	GCGGACCGCT	ATCAGGACAT	AGCGTTGGCT	ACCCGTGATA	TTGCTGAAGA	5940
GCTTGGCGCC	GAATGGGCTG	ACCGCTTCCT	CGTGCTTTAC	GGTATCGCCG	CTCCCGATTC	6000
GCAGCGCATC	GCCTTCTATC	GCCTTCTTGA	CGAGTTCTTC	TGAGCGGGAC	TCTGGGGTTC	6060
GAAATGACCG	ACCAAGCGAC	GCCCAACCTG	CCATCAGGAG	ATTTGATTC	CACCGCCGCC	6120
TTCTATGAAA	GGTTGGGCTT	CGGAATCGTT	TTCCGGGACG	CCGGCTGGAT	GATCCTCCAG	6180
CGCGGGGATC	TCATGCTGGA	GTTCTTCGCC	CACCCCAACT	TGTTTATTGC	AGCTTATAAT	6240
GGTTACAAAT	AAAGCAATAG	CATCACAAAT	TTACAAATA	AAGCATTTTT	TTCACTGCAT	6300
TCTAGTTGTG	GTTTGTCCAA	ACTCATCAAT	CTATCTTATC	ATGTCTGGAT	CGCGGCCGCG	6360
ATCCCGTCGA	GAGCTTGCGG	TAATCATGGT	CATAGCTGTT	TCCTGTGTGA	AATTGTTATC	6420
CGCTCACAAAT	TCCACACAAC	ATACGAGCCG	GAAQCATAAA	GTGTAAAGCC	TGGGGTGCCT	6480
AATGAGTGAG	CTAACTCACA	TTAATTGCGT	TGCGCTCACT	GCCCCGCTTC	CAGTCGGGAA	6540

ACCTGTCGTG	CCAGCTGCAT	TAATGAATCG	GCCAACCCGC	GGGGAGAGGC	GGTTTGCGTA	6600
TTGGGGCGTC	TTCCGCTTCC	TCGCTCACTG	ACTCGCTGCG	CTCGGTGCTT	CGGCTGCGGC	6660
GAGCCGTATC	AGCTCACTCA	AAGGCGGTAA	TACGGTTATC	CACAGAATCA	GGGGATAACG	6720
CAGGAAAGAA	CATGTGACCA	AAAGGCCAGC	AAAAGGCCAG	GAACCGTAAA	AAGGCCGCGT	6780
TGCTGGCGTT	TTTCCATAGG	CTCCGCCCCC	CTGACGAGCA	TCACAAAAAT	CGACGCTCAA	6840
GTCAGAGGTG	GCGAAACCCG	ACAGGACTAT	AAAGATACCA	GGCGTTTCCC	CCTGGAAGCT	6900
CCCTCGTCCG	CTCTCCTGTT	CCGACCCTGC	CGCTTACCGG	ATACCTGTCC	GCCTTCTCTC	6960
CTTCGGGAAG	CGTCCCGCTT	TCTCAATGCT	CACGCTGTAG	GATCTCTCAGT	TCGGTGTAGG	7020
TCGTTGCTC	CAAGCTGGGC	TGTGTGCACG	AACCCCCCGT	TCAGCCCGAC	CGCTGCGCCT	7080
TATCCGGTAA	CTATCGTCTT	GAGTCCAACC	CGGTAAGACA	CGACTTATCG	CCACTGQCAG	7140
CAGCCACTGG	TAACAGGATT	AGCAGAGCGA	GCTATGTAGG	CGGTGCTACA	GAGTTCTTGA	7200
AGTGGTGGCC	TAACTACGGC	TACACTAGAA	GGACAGTATT	TGGTATCTGC	GCTCTGCTGA	7260
AGCCAGTTAC	CTTCGGAAAA	AGAGTTGGTA	GCTCTTGATC	CGGCAAACAA	ACCACCGCTG	7320
GTAGCGGTGG	TTTTTTTGTG	TGCAAGCAGC	AGATTACGGG	CAGAAAAAAA	GGATCTCAAG	7380
AAGATCCTTT	GATCTTTTCT	ACGGGGTCTG	ACGCTCAGTG	GAACGAAAAC	TCACGTTAAG	7440
GGATTTTGGT	CATGAGATTA	TCAAAAAGGA	TCTTCACCTA	GATCCTTTTA	AATTAAAAAT	7500
GAAGTTTTAA	ATCAATCTAA	AGTATATATG	AGTAAACTTG	GTCTGACAGT	TACCAATGCT	7560
TAATCAGTGA	GGCACCTATC	TCAGCGATCT	GTCTATTTCC	TTCATCCATA	GTTGCCTGAC	7620
TCCCCGTCGT	GTAGATAACT	ACGATACGGG	AGGGCTTACC	ATCTGGCCCC	AGTGCTGCAA	7680
TGATACCGCG	AGACCCACGC	TCACCGGCTC	CAGATTTATC	AGCAATAAAC	CAGCCAGCCG	7740
GAAGGGCCGA	GCQCAGAAGT	GGTCCTGCAA	CTTTATCCGC	CTCCATCCAG	TCTATTAATT	7800
GTTGCCGGCA	AGCTAGAGTA	AGTAGTTCGC	CAGTTAATAG	TTTGCGCAAC	GTTGTTGCCA	7860
TTGCTACAGG	CATCGTGGTG	TCACGCTCGT	CGTTTGGTAT	GGCTTCATTC	AGCTCCGGTT	7920
CCCAACGATC	AAGGCGAGTT	ACATGATCCC	CCATGTTGTG	CAAAAAAGCG	GTTAGCTCCT	7980
TCGGTCCCTC	GATCGTTGTC	AGAAGTAAGT	TGGCCGCACT	GTTATCACTC	ATGGTTATGG	8040
CAGCACTGCA	TAATTCTCTT	ACTGTCAATG	CATCCGTAAG	ATGCTTTTCT	GTGACTGGTG	8100
AGTACTCAAC	CAAGTCATTC	TGAGAATAGT	GTATGCGCGG	ACCGAGTTGC	TCTTGCCCCG	8160
CGTCAATACG	GGATAATACC	GCGCCACATA	GCAGAACTTT	AAAAGTGCTC	ATCATTGGAA	8220
AACGTTCTTC	GGGCGAAAA	CTCTCAAGGA	TCTTACCGCT	GTTGAGATCC	AGTTCCGATGT	8280
AACCCACTCG	TGCACCCAAC	TGATCTTCAQ	CATCTTTTAC	TTTCACCAGC	GTTTCTGGGT	8340
GAGCAAAAAC	AGGAAGGCAA	AATGCCGCAA	AAAAGGGAAT	AAGGGCGACA	CGGAAATGTT	8400

GAATACTCAT ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA 8460  
 TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT 8520  
 TTCCCCAAA AGTGCCACCT 8540

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-  
 TAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 9209 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

10

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: cirkuláris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: igen

ANTISZENZ: nem

A 2. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAA AGCCTCCTCA CTA CTCTCTGG AATAGCTCAG 60  
 AGGCCGAGGC G3CCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCCA TGCATGGGGC 120  
 GGAGAATGGG CGGA ACTGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180  
 ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240  
 GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300  
 GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAT TAAT TCCCCT 360  
 AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTCCCGC 420  
 GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCAT TG 480  
 ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540  
 TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600  
 AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATT A TGCCAGTAC 660  
 ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720  
 ATGGTGATGC GGT TTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780  
 TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840  
 GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900  
 CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960  
 CATCACAGAT CTCTCACTAT GGATTTTCAG GTGCAGATTA TCAGCTTCCT GCTAATCAGT 1020  
 GCTTCAGTCA TAATGTCCAG AGGACAAAT GTTCTCTCCC AGTCTCCAGC AATCCTGTCT 1080  
 GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TGCAGGGCCA GCTCAAGTGT AAGTTACATC 1140  
 CACTGGTTCC AGCAGAAGCC AGGATCCTCC CCCAAACCCT GGATTTATGC CACATCCAAC 1200  
 CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC T TACTCTCTC 1260  
 ACAATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTATT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT 1320  
 AACCCACCCA CGTTCGGAGG GGGGACCAAG CTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1380

TCTGTCTTCA	TCTTCCCGCC	ATCTGATGAG	CAGTTGAAAT	CTGGAAGTGC	CTCTGTTGTG	1440
TGCCTGCTGA	ATAACTTCTA	TCCCAGAGAG	GCCAAAGTAC	AGTGGAAGGT	GGATAACGCC	1500
CTCCAATCGG	GTAAC TCCCA	GGAGAGTGTC	ACAGAGCAGG	ACAGCAAGGA	CAGCACCTAC	1560
AGCCTCAGCA	GCACCCTGAC	GCTGAGCAAA	GCAGACTACG	AGAAACACAA	AGTCTACGCC	1620
TGCCAAGTCA	CCCATCAGGG	CCTGAGCTCG	CCCCTCACAA	AGAGCTTCAA	CAGGGGAGAG	1680
TGTTGAAATC	AGATCCGTTA	ACGGTTACCA	ACTACCTAGA	CTGGATTTCGT	GACAACATCC	1740
GGCCGTGATA	TCTACGTATG	ATCAGCCTCG	ACTGTGCCTT	CTAGTTGCCA	GCCATCTGTT	1800
GTTTGCCCTT	CCCCCGTGCC	TTCCTTGACC	CTGGAAGGTG	CCACTCCCAC	TGTCCTTTCC	1860
TAATAAAATG	AGGAAATTGC	ATCGCATTGT	CTGAGTAGGT	GTCATTCTAT	TCTGGGGGGT	1920
GGGGTGGGGC	AGGACAGCAA	GGGGGAGGAT	TGGGAAGACA	ATAGCAGGCA	TGCTGGGGAT	1980
GCGGTGGGCT	CTATGGAACC	AGCTGGGGCT	CGACAGCTAT	GCCAAGTACG	CCCCCTATTG	2040
ACGTCAATGA	CGGTAAATGG	CCC GCCTGGC	ATTATGCCCA	GTACATGACC	TTATGGGACT	2100
TTCCTACTTG	GCAGTACATC	TACGTATTAG	TCATCGCTAT	TACCATGGTG	ATGCGGTTTT	2160
GGCAGTACAT	CAATGGGCGT	GGATAGCGGT	TTGACTCACG	GGGATTTCCA	AGTCTCCACC	2220
CCATTGACGT	CAATGGGAGT	TTGTTTTGGC	ACCAAATCA	ACGGGACTTT	CCAAAATGTC	2280
GTAACAATC	CGCCCCATTG	ACGCAAATGG	GCGGTAGGCG	TGTACGGTGG	GAGGTCTATA	2340
TAAGCAGAGC	TGGGTACGTC	CTCACATTCA	GTGATCAGCA	CTGAACACAG	ACCCGTCGAC	2400
ATGGGTGGGA	GCCTCATCTT	GCTCTTCCTT	GTCGCTGTTG	CTACGCGTGT	CCTGTCCCAG	2460
GTACAATGC	AGCAGCCTGG	GGCTGAGCTG	GTGAAGCCTG	GGGCCTCAGT	GAAGATGTCC	2520
TGCAAGGCTT	CTGGCTACAC	ATTTACCAGT	TACAATATGC	ACTGGGTAAA	ACAGACACCT	2580
GGTCGGGGCC	TGGAATGGAT	TGGAGCTATT	TATCCCGGAA	ATGGTGATAC	TTCCTACAAT	2640
CAGAAGTTCA	AAGGCAAGGC	CACATTGACT	GCAGACAAAT	CCTCCAGCAC	AGCCTACATG	2700
CAGCTCAGCA	GCCTGACATC	TGAGGACTCT	GCGGTCTATT	ACTGTGCAAG	ATCGACTTAC	2760
TACGGCGGTG	ACTGGTACTT	CAATGTCTGG	GGCGCAGGGA	CCACGGTCAC	CGTCTCTGCA	2820
GCTAGCACCA	AGGGCCCATC	GGTCTTCCCC	CTGGCACCCT	CCTCCAAGAG	CACCTCTGGG	2880
GGCACAGCGG	CCCTGGGCTG	CCTGGTCAAG	GACTACTTCC	CCGAACCGGT	GACGGTGTCC	2940
TGGAACTCAG	GCGCCCTGAC	CAGCGGCGTG	CACACCTTCC	CGGCTGTCCT	ACAGTCCTCA	3000
GGACTCTACT	CCCTCAGCAG	CGTGGTGACC	GTGCCCTCCA	GCAGCTTGGG	CACCCAGACC	3060
TACATCTGCA	ACGTGAATCA	CAAGCCCAGC	AACACCAAGG	TGGACAAGAA	AGCAGAGCCC	3120
AAATCTTGTG	ACAAAATCA	CACATGCCCA	CCGTGCCCAG	CACCTGAACT	CCTGGGGGGA	3180

CCGTCAGTCT	TCCTCTTCCC	CCCAAACCC	AAGGACACCC	TCATGATCTC	CCGGACCCCT	3240
GAGGTACAT	GCGTGGTGGT	GGACGTGAGC	CACGAAGACC	CTGAGGTCAA	GTTCAACTGG	3300
TACGTGGACG	GCGTGGAGGT	GCATAATGCC	AAGACAAAGC	CGCGGGAGGA	GCAGTACAAC	3360
AGCACGTACC	GTGTGGTCAG	CGTCCTCACC	GTCTCTGCACC	AGGACTGGCT	GAATGGCAAG	3420
GAGTACAAGT	GCAAGGTCTC	CAACAAAGCC	CTCCCAGCCC	CCATCGAGAA	AACCATCTCC	3480
AAAGCCAAAG	GGCAGCCCCG	AGAACCACAG	GTGTACACCC	TCCCCCATC	CCGGGATGAG	3540
CTGACCAAGA	ACCAGGTCAG	CCTGACCTGC	CTGGTCAAAG	GCTTCTATCC	CAGCGACATC	3600
CCCGTGGAGT	GGGAGAGCAA	TGGGCAGCCG	GAGAACAAC	ACAAGACCAC	GCCTCCCCTG	3660
CTGGACTCCG	ACGGCTCCTT	CTTCCTCTAC	AGCAAGCTCA	CCGTGGACAA	GAGCAGGTGG	3720
CAGCAGCGGA	ACGTCTTCTC	ATGCTCCGTG	ATGCATGAGG	CTCTGCACAA	CCACTACACG	3780
CAGAAGAGCC	TCTCCCTGTC	TCCGGCTAAA	TGAGGATCCG	TTAACGGTTA	CCAACTACCT	3840
AGACTGGATT	CGTGACAACA	TGCGGCCGTG	ATATCTACGT	ATGATCAGCC	TCGACTGTGC	3900
CTTCTAGTTG	CCAGCCATCT	GTTGTTTGCC	CCTCCCCCGT	GCCTTCCTTG	ACCCTGGAAG	3960
GTCCCACTCC	CACTGTCTTT	TCCTAATAAA	ATGAGGAAAT	TGCATCGCAT	TGTCTGAGTA	4020
GGTGTCAATC	TATTCTGGGG	GGTGGGGTGG	GGCAGGACAG	CAAGGGGGAG	GATTGGGAAG	4080
ACAATAGCAG	GCATGCTGGG	GATGCCGTGG	GCTCTATGGA	ACCAGCTGGG	GCTCGACAGC	4140
GCTGGATCTC	CCGATCCCCA	GCTTTGCTTC	TCAATTTCTT	ATTTGCATAA	TGAGAAAAAA	4200
AGGAAATA	ATTTAACAC	CAATTCAGTA	GTTGATTGAG	CAAATGCGTT	GCCAAAAGG	4260
ATGCTTTAGA	GACAGTGTTC	TCTGCACAGA	TAAGGACAAA	CATTATTCAG	AGGGACTACC	4320
CAGAGCTGAG	ACTCCTAAGC	CAGTQAGTGG	CACAGCATTC	TAGGGAGAAA	TATGCTTGTC	4380
ATCACCGAAG	CCTGATTCCG	TAGAGCCACA	CCTTGGTAAG	GGCCAATCTG	CTCACACAGG	4440
ATAGACAGGG	CAGGAGCCAG	GGCAGAGCAT	ATAAGGTGAG	GTAGGATCAG	TTGCTCCTCA	4500
CAATTTGCTTC	TGACATAGTT	GTGTTGGGAG	CTTGGATAGC	TTGGACAGCT	CAGGGCTGCG	4560
ATTTCCGGCC	AACTTGACC	GCAATCCTAG	CGTGAAGGCT	GGTACGATTT	TATCCCCGCT	4620
GCCATCATGG	TTCGACCATT	GAACTGCATC	GTGCCCCGTCT	CCCAAAATAT	GGGGATTGGC	4680
AAGAACGGAG	ACCTACCCTG	GCCTCCGCTC	AGGAACGAGT	TCAAGTACTT	CCAAAGAATG	4740
ACCACAACCT	CTTCAGTGGA	AGGTAACAG	AATCTGGTGA	TTATGGGTAG	GAAAACCTGG	4800
TTCTCCATTC	CTGAGAAGAA	TGGACCTTTA	AAGGACAGAA	TTAATATAGT	TCTCACTAGA	4860
GAACTCAAAG	AACCACCACG	AGGAGCTCAT	TTTCTTGCCA	AAAGTTTGGG	TGATGCCTTA	4920
AGACTTATTG	AACAACCGGA	ATTGGCAAGT	AAAGTAGACA	TCGTTTGGAT	AGTCGGAGGC	4980
AGTTCTGTTT	ACCAGGAAGC	CATGAATCAA	CCAGGCCACC	TTAGACTCTT	TGTGACAAGG	5040
ATCATGCAGG	AATTTGAAAAG	TGACACGTTT	TTCCCAGAAA	TTGATTTGGG	GAAATATAAA	5100

CTTCTCCCAG	AATACCCAGG	CGTCCTCTCT	GAGGTCCAGG	AGGAAAAAGG	CATCAAGTAT	5160
AAGTTTGAAG	TCTACGAGAA	GAAAGACTAA	CAGGAAGATG	CTTCAAGTT	CTCTGCTCCC	5220
CTCCTAAAGC	TATGCATTTT	TATAAGACCA	TGGGACTTTT	GCTGGCTTTA	GATCAGCCTC	5280
GACTGTGCCT	TCTAGTTGCC	AGCCATCTGT	TGTTTGCCCC	TCCCCCGTGC	CTTCCTTGAC	5340
CCTGGAAGGT	GCCACTCCCA	CTGTCCTTTC	CTAATAAAAT	GAGGAAATTG	CATCGCATTG	5400
TCTGAGTAGG	TGTCATTCTA	TTCTGGGGGG	TGGGGTGGGG	CAGGACAGCA	AGGGGGAGGA	5460
TTGGGAAGAC	AATAGCAUGC	ATGCTGOGJA	TGCGGTGGBG	TCTATGGAAC	CAGCTGGGGC	5520
TCGAGCTACT	AGCTTTGCTT	CTCAATTTCT	TATTTGCATA	ATGAGAAAAA	AAGGAAAATT	5580
AATTTTAACA	CCAATTCAGT	AGTTGATTGA	GCAAATGCGT	TGCCAAAAAG	GATGCTTTAG	5640
AGACAGTGTT	CTCTGCACAG	ATAAGGACAA	ACATTATTCA	GAGGGAGTAC	CCAGAGCTGA	5700
GACTCCTAAG	CCAGTGAGTG	GCACAGCATT	CTAGGGAGAA	ATATGCTTGT	CATCACCGAA	5760
GCCTGATTCC	GTAGAGCCAC	ACCTTGGTAA	GGCCAATCT	GCTCACACAG	GATAGAGAGG	5820
GCAGGAGCCA	GGCAGAGCA	TATAAGGTGA	GGTAGGATCA	GTTGCTCCTC	ACATTTGCTT	5880
CTGACATAGT	TGTGTTGGGA	GCTTGGATCG	ATCCTCTATG	GTTGAACAAG	ATGGATTGCA	5940
CGCAGGTTCT	CCGCCCCTT	GGGTGGAGAG	GCTATTCGGC	TATGACTGGG	CACAACAGAC	6000
AATCGGCTGC	TCTGATGCCG	CCGTGTTCCG	GCTGTCAGCG	CAGGGGCGCC	CGGTTCTTTT	6060
TGTC AAGACC	GACCTGTCCG	GTGCCCTGAA	TGAACTGCAG	GACGAGGCAG	CGCGGCTATC	6120
GTGGCTGGCC	ACGACGGGCG	TTCCTTGCGC	AGCTGTGCTC	GACGTTGTCA	CTGAAGCGGG	6180
AAGGGACTGG	CTGCTATTGG	GCGAAGTGCC	GGGGCAGGAT	CTCCTGTTCAT	CTCACCTTGC	6240
TCCTGCCGAG	AAAGTATCCA	TCATGGCTGA	TGCAATGCGG	CGGCTGCATA	CGCTTGATCC	6300
GGCTACCTGC	CCATTCGACC	ACCAAGCGAA	ACATCGCATC	GAGCGAGCAC	GTA CT CGGAT	6360
GGAAGCCGGT	CTTGTCGATC	AGGATGATCT	GGACGAAGAG	CATCAGGGGC	TCGCGCCAGC	6420
CGAACTGTTC	GCCAGGCTCA	AGGCGCGCAT	GCCCCGCGGC	GAGGATCTCG	TCGTGACCCA	6480
TGGCGATGCC	TGCTTGCCGA	ATATCATGGT	GGAAAATGGC	CGCTTTTCTG	GATTCATCGA	6540
CTGTGGCCGG	CTGGGTGTGG	CGGACCGCTA	TCAGGACATA	GCGTTGGCTA	CCCGTGATAT	6600
TGCTGAAGAG	CTTGGCGGGC	AATGGGCTGA	CCGCTTCCTC	GTGCTTTACG	GTATCGCCGC	6660
TCCCCGATTCG	CAGCGCATCG	CCTTCTATCG	CCTTCTTGAC	GAGTTCTTCT	GAGCGGGACT	6720
CTGGGGTTCG	AAATGACCGA	CCAAGCGACG	CCCAACCTGC	CATCACGAGA	TTTCGATTCC	6780
ACCGCCGCCT	TCTATGAAAG	GTTGGGCTTC	GGAATCGTTT	TCCGGGACGC	CGGCTGGATG	6840
ATCCTCCAGC	GCGGGGATCT	CATGCTGGAG	TTCTTCGCCC	ACCCCAACTT	GTTTATTGCA	6900

GCTTATAATG	GTTACAAATA	AAGCAATAGC	ATCACAAATT	TCACAAATAA	AGCATTTTTT	6960
TCACTGCATT	CTAGTTGTGG	TTTGTCCAAA	CTCATCAATC	TATCTTATCA	TGTCTGGATC	7020
GCGGCCGCGA	TCCCGTCGAG	AGCTTGGCGT	AATCATGGTC	ATAGCTGTTT	CCTGTGTGAA	7080
ATTGTTATCC	GCTCACAATT	CCACACAACA	TACGAGCCGG	AAGCATAAAG	TGTAAAGCCT	7140
GGGGTCCCTA	ATGAGTGAGC	TAACTCACAT	TAATTGCGTT	GCGCTCACTG	CCCGCTTCC	7200
AGTCGGGAAA	CCTGTGCTGC	CAGCTGCATT	AATGAATCGG	CCAACGGCGG	GGGAGAGCCG	7260
GTTTCCCTAT	TGGCCGCTCT	TCCGCTTCCCT	CGCTCACTGA	CTCGCTGCGC	TGGTCTGTTT	7320
CGCTGCGGGG	AGCGGTATCA	GCTCACTCAA	AGGCGGTAAT	ACGGTTATCC	ACAGAATCAG	7380
GGGATAACGC	AGGAAAGAAC	ATGTGAGCAA	AAGGCCAGCA	AAAGGCCAAG	AACCGTAAAA	7440
AGCCCGCGTT	GCTGGCGTTT	TTCCATAGCC	TCCGCCCCCC	TGACCGAGCAT	CACAAAAATC	7500
GACGCTCAAG	TCAGAGGTGG	CGAAACCCGA	CAGGACTATA	AAGATACCAG	GCGTTTCCCC	7560
CTGGAAGCTC	CCTCGTCCGC	TCTCCTGTTT	CGACCCCTGC	GCTTACCGGA	TACCTGTCCG	7620
CCTTTCTCCC	TTCGGGAAGC	GTGGCCGTTT	CTCAATGCTC	ACGCTGTAGG	TATCTCAGTT	7680
CGGTGTAGGT	CGTTCGCTCC	AAGCTGGGCT	GTGTGCACGA	ACCCCCCGTT	CAGCCCCGAC	7740
GCTGCGCCTT	ATCCGGTAAC	TATCGTCTTG	AGTCCAACCC	GGTAAGACAC	GACTTATCGC	7800
CACTGGCAGC	AGCCACTGGT	AACAGGATTA	CCAGAGCCAG	GTATGTAGGC	GGTGCTACAG	7860
AGTTCTTGAA	GTGGTGGCCT	AACTACGGCT	ACACTAGAAG	GACAGTATTT	GGTATCTGCG	7920
CTCTGCTGAA	GCCAGTTACC	TTCCGAAAAA	GAGTTGGTAG	CTCTTGATCC	GGCAAAACAA	7980
CCACCGCTGG	TAGCGGTGGT	TTTTTTGTTT	GCAAGCAGCA	GATTACCGCG	AGAAAAAAG	8040
GATCTCAAGA	AGATCCTTTG	ATCTTTTCTA	CGGGCTCTGA	CGCTCAGTGG	AACGAAAACT	8100
CACGTTAAGG	GATTTTGGTC	ATGAGATTAT	CAAAAAGGAT	CTTCACCTAG	ATCCTTTTAA	8160
ATTA AAAATG	AAGTTTTAAA	TCAATCTAAA	GTATATATGA	GTA AACTTGG	TCTGACAGTT	8220
ACCAATGCTT	AATCAGTGAG	GCACCTATCT	CAGCGATCTG	TCTATTTCCG	TCATCCATAG	8280
TTGCCTGACT	CCCCGTCCGT	TAGATAACTA	CGATACGGGA	GGGCTTACCA	TCTGGCCCCA	8340
GTGCTGCAAT	GATACCGCGA	GACCCACGCT	CACCGGCTCC	AGATTTATCA	GCAATAAACC	8400
AGCCAGCCGG	AAGGGCCGAG	CGCAGAAAGT	GTCCCTGCAAC	TTTATCCGCC	TCCATCCAGT	8460
CTATTAATTG	TTGCCGGGAA	GCTAGAGTAA	GTA GTTCCGC	AGTTAATAGT	TTGGCCAACG	8520
TTGTTGCCAT	TGCTACAGGC	ATCGTGGTGT	CACGCTCGTC	GTTTGGTATG	GCTTCATTCA	8580
GCTCCGGTTC	CCAACGATCA	AGGCGAGTTA	CATGATCCCC	CATGTTGTGC	AAAAAAGCGG	8640
TTAGCTCCTT	CGTCCCTCCG	ATCGTTGTCA	GAAGTAAAGT	GGCCGCAGTG	TTATCACTCA	8700
TGGTTATGGC	AGCACTGCAT	AATCTCTTA	CTGTCA TGCC	ATCCGTAAGA	TGCTTTTCTG	8760

TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCCGA CCGAGTTGCT 8820  
 CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA 8880  
 TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940  
 GTTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG 9000  
 TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC 9060  
 GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT 9120  
 ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTC 9180  
 CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT 9209

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-  
 TAI: HÁNY SZÁLÚ: egy  
 A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: TOPOLOGIÁJA: lineáris  
 HOSSZA: 54 bázispár 20 MOLEKULATÍPUS: genomi DNS  
 TÍPUSA: nukleinsav HIPOTETIKUS: igen  
 ANTISZENZSZ: nem

A 3. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:  
 5' ATC ACA GAT CTC TCA CCA TGG ATT TTC AGG TBC AGA TTA TCA GCT 52  
 TC 3' 2

A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-  
 TAI: 5' TGC AGC ATC CGT ACG TTT GAT TTC  
 CAG CTT 3'  
 A SZEKVENCIA JELLEMZŐI: AZ 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA  
 HOSSZA: 30 bázispár 30 AADATAI:  
 TÍPUSA: nukleinsav A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:  
 HÁNY SZÁLÚ: egy HOSSZA: 384 bázispár  
 TOPOLOGIÁJA: lineáris TÍPUSA: nukleinsav  
 MOLEKULATÍPUS: genomi DNS HÁNY SZÁLÚ: egy  
 HIPOTETIKUS: igen 35 TOPOLOGIÁJA: lineáris  
 ANTISZENZSZ: igen MOLEKULATÍPUS: genomi DNS  
 A 4. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LE-  
 ÍRÁSA: HIPOTETIKUS: igen  
 ANTISZENZSZ: nem

Az 5. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCT TCA GTC 51  
 ATA ATG TCC AGA GGG CAA ATT GTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT 102  
 GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA 153  
 AGT TAC ATC CAC TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG 204  
 ATT TAT GCC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC 255  
 AGT GGG TCT GGG ACT TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA 306  
 GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG ACT AGT AAC CCA CCC ACG TTC 357  
 GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA 384

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-TAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 27 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: igen

ANTISZENZS: nem

A 6. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

5' GCG GCT CCC ACG CGT GTC CTG TCC CAG 3' 27

A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-TAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 29 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:

ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT GTC	51
CTG TCC CAG GTA CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG	102
GCC TCA GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT ACC AGT TAC	153
AAT ATG CAC TGG GTA AAA CAG ACA CCT GGT CGG GGC CTG GAA TGG ATT GGA	204
GCT ATT TAT CCC GGA AAT GGT GAT ACT TCC TAC AAT CAG AAG TTC AAA GGC	255
AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC	306
AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAT TAC TGT GCA AGA TCG ACT	357
TAC TAC GGC GGT GAC TGG TAC TTC AAT GTC TGG GGC GCA GCG ACC ACG GTC	408
ACC GTC TCT GCA	420

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Az „American Type Culture Collection” intézetnél ATCC 69119 deponálási számon letétbe helyezett 45 TCAE8-plazmidban található anti-CD20-ellenanyagot kódoló gént tartalmazó transzfektómából származó, immunológiailag aktív kiméra-ellenanyag, B-sejtes limfóma kezelésében történő alkalmazásra.

2. Az 1. igénypont szerinti ellenanyag 0,001 és 50 mg ellenanyag/testtömeg-kg közötti mennyiségben, B-sejtes limfóma kezelésében történő alkalmazásra.

3. Immunológiailag aktív kiméra anti-CD20-ellenanyag, *azzal jellemezve*, hogy TCAE8-plazmidban 55 (ATCC deponálási szám: 69119) található anti-CD20-ellenanyagot kódoló gént tartalmazó transzfektómából lett izolálva.

4. A 3. igénypont szerinti ellenanyag, *azzal jellemezve*, hogy radioaktívan jelölve van. 60

HÁNY SZÁLÚ: egy  
TOPOLÓGIÁJA: lineáris  
MOLEKULATÍPUS: genomi DNS  
HIPOTETIKUS: igen

5 ANTISZENZS: igen  
A 7. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA LEÍRÁSA:  
5' GGS TGT TGT GCT AGC TGM RGA GAC RGT GA 3' 29

A 8. AZONOSÍTÓ SZÁMÚ SZEKVENCIA ADA-TAI:

A SZEKVENCIA JELLEMZŐI:

HOSSZA: 420 bázispár

TÍPUSA: nukleinsav

HÁNY SZÁLÚ: egy

TOPOLÓGIÁJA: lineáris

MOLEKULATÍPUS: genomi DNS

HIPOTETIKUS: igen

ANTISZENZS: nem

5. Anti-CD20-ellenanyagot szekretáló hibridóma, *azzal jellemezve*, hogy az „American Type Culture Collection” intézetben van letétbe helyezve, HB 11388 deponálási számon.

6. Monoklonális ellenanyag, *azzal jellemezve*, hogy az 5. igénypont szerinti hibridóma szekretálta.

7. A 6. igénypont szerinti ellenanyag, *azzal jellemezve*, hogy radioaktívan van jelölve.

8. A 7. igénypont szerinti radioaktívan jelölt ellenanyag, *azzal jellemezve*, hogy az alábbi izotópok valamelyikével van radioaktívan jelölve: itrium[90], indium[111] vagy jód[131].

9. A 7. igénypont szerinti ellenanyag, B-sejtes limfóma kezelésében történő alkalmazásra.

10. A 7. igénypont szerinti, itrium[90] izotóppal jelölt ellenanyag, B-sejtes limfóma kezelésében történő alkalmazásra.

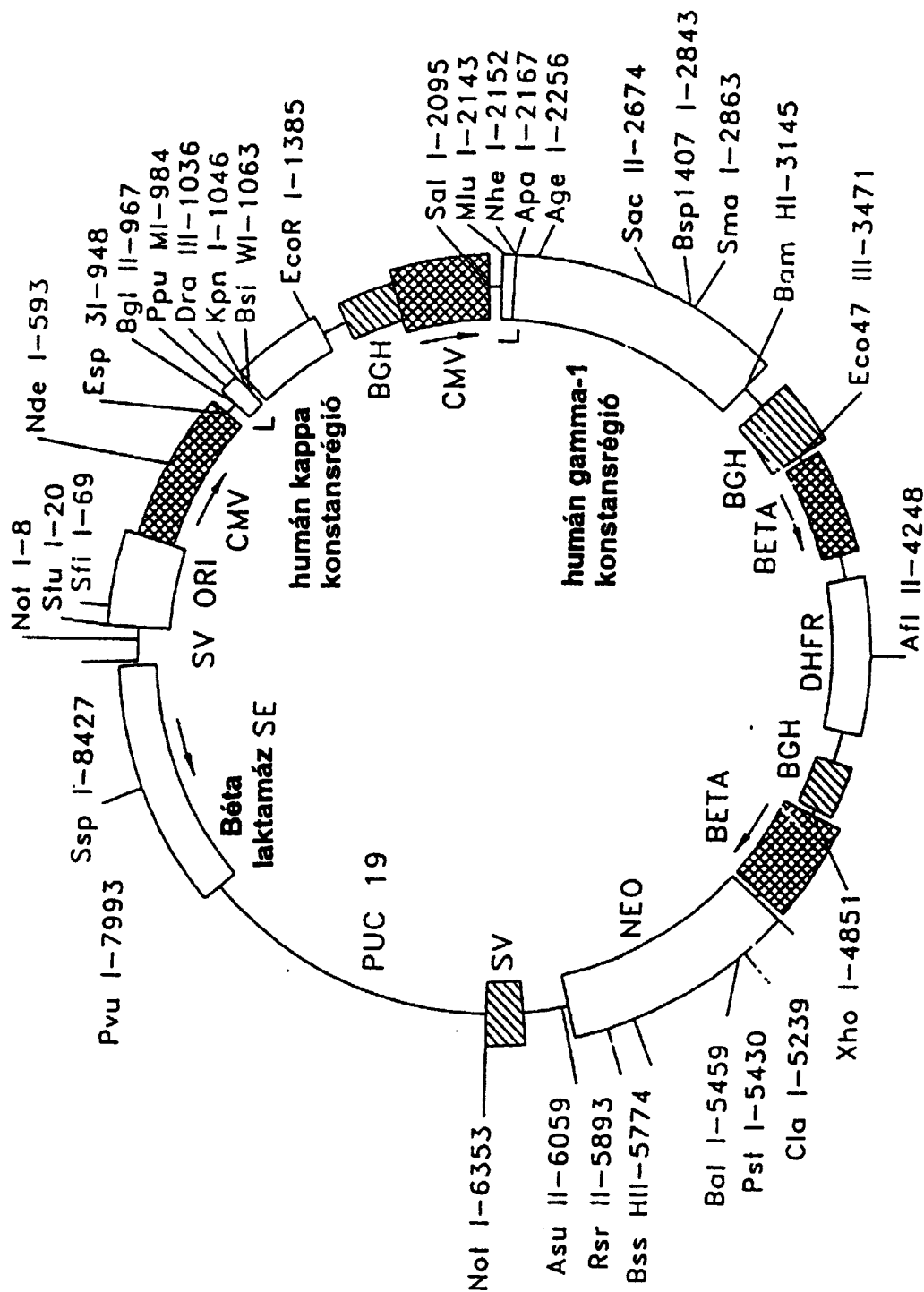
11. Az „American Type Culture Collection” intézetnél ATCC 69119 deponálási számon letétbe helyezett

TCAE8-plazmidban található anti-CD20-ellenanyagot kódoló gént tartalmazó transzfektómából származó, radioaktívan jelzett immunológiailag aktív kiméra-ellenanyag, B-sejtes limfóma kezelésében történő alkalmazásra.

12. A 11. igénypont szerinti – az „American Type Culture Collection” intézetben HB 11388 deponálási számon letétbe helyezett hibridóma által szekretált – monoklonális ellenanyag B-sejtes limfóma kezelésében történő alkalmazásra.

5

13. Eljárás anti-CD20-ellenanyag előállítására, *azzal jellemezve*, hogy az „American Type Culture Collection” intézetnél ATCC 69119 deponálási számon letétbe helyezett TCAE8-plazmidban található anti-CD20-ellenanyagot kódoló gént tartalmazó transzfektómasejtekkel vagy a HB 11388 deponálási számon letétbe helyezett hibridómasejtekkel ellenanyagot termeltetünk, és a termelődött ellenanyagot izoláljuk.



1. ábra

LINKER #1 15bp | SV40 ORIGIN=332bp  
 GACGTCGCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAAA AGCCTCCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60  
 AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCAGCLA TGCATGGGGC 120  
 GGAGAATGGG CCGAACTGGG CGGAGTTAGG GGCGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180  
 ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240  
 GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGACTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300  
 GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAGAAAT TAATTTCCCT | 360  
 | 347 8 | 360 1  
 AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420  
 GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCCATTG 480  
 CMV PROMOTER-ENHANCER=567bp  
 ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540  
 TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTSTA TCATATGCCA 600  
 AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGCCAGTAC 660  
 ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720  
 ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780  
 TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840  
 GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900  
 CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACCTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960  
 | 727 8 |  
 Bgl II | LEADER=60bp  
 CATCACAGAT CTCTACCAT GAGGGTCCCC GCTCAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG 1020  
 | 978 9 |  
 +1 | 101 102 | 107 | 108  
 CTCCCAGGTG CACGATGTGA TGGTACCAAG GTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1080  
 | 1038 9 | | 1062 3 Bsi WI |  
 TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAAGTGC CTCTGTTGTG 1140  
 TGCCTGCTGA ATAATTCTA TCCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGAAGGT GGATAACGCC 1200  
 HUMAN KAPPA CONSTANT 324bp 107 AMINO ACID & STOP CODON  
 CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1260  
 AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTACG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1320  
 TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTACAAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1380  
 STOP  
 LIGHT CHAIN | Eco RI | LINKER #4=85bp  
 TGTGGAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATGC 1440  
 | 1386 7 |  
 GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1500  
 | 1471 2 |

2A. ábra

GTTTGCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC TGTCCCTTCC 1560  
 TAATAAAATG AGGAAATTGC **BGH poly A=231bp** ATCGCATGTG CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1620  
 GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1680  
 GCGGTGGGCT CTATGGAACC **LINKER #5=15bp** AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 1740  
 1702<sup>3</sup> 1717<sup>8</sup>  
 ACGTCAATGA CGGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 1800  
 TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 1860  
 GGCAGTACAT CAATGGGCGT **CMV PROMOTER-ENHANCER=334bp** GGATAGCGGT TTGACTCACC GGGATTTCCA AGTCTCCACC 1920  
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAATGTC 1980  
 GTAACAATC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2040  
 TAAGCAGAGC **LINKER #6=7bp** TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG **Sal I** ACCCGTCGAC 2100  
 2051<sup>2</sup> 2058<sup>9</sup> **LEADER=51bp** **Mlu I 2151 | 2 Nhe I**  
 ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGCGTGT **CGCTAGCACC** 2160  
 START HEAVY CHAIN -5 -4 -3 114 115  
 AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCTGGCACCC TCCTCCAAGA GCACCTCTGG GGGCACAGCG 2220  
 GCCCTGGGCT GCCTGGTCAA GGACTACTTC CCCGAACCGG TGACGGTGTC GTGGAACTCA 2280  
 GCGGCCCTGA CCAGCGGCGT GCACACCTTC CCGGCTGTCC TACAGTCCIC AGGACTCFAI 2340  
 TCCCTCAGCA GCGTGGTGAC **HUMAN GAMMA I CONSTANT** CGTGCCCTCC AGCAGCTTG GCACCCAGAC CTACATCTGC 2400  
**993bp=330 AMINO ACID & STOP CODON**  
 AACGTGAATC ACAAGCCCAG CAACACCAAG GTGGACAAGA AAGCAGAGCC CAAATCTTGT 2460  
 GACAAAATC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCACCTGAAC TCCTGGGGGG ACCGTCAGTC 2520  
 TTCCTCTTCC CCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC TGAGGTGACA 2580  
 TCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC 2640  
 GCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG AGCAGTACAA CAGCACGTAC 2700  
 CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA GGACTIONAAG 2760  
 TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA 2820  
 GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT CCCGGGATGA GCTGACCAGE 2880  
 AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGCTTCTATC CCAGCGACAT CGCCGTGGAG 2940  
 TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT GCTGGACTCC 3000

2B. ábra

GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGAC- AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG 3060  
AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC GCAGAAGAGC 3120  
STOP HEAVY CHAIN |Bam HI LINKER #7=81bp  
CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA ATGAGGATCC GTTAACGGTT ACCAACTACC TAGACTGGAT 3180  
3144 15  
TCGTGACAAC ATGCGCCCGT GATATCTACG TATGATCAGC CTGGACTGTG CCTTCTAGTT 3240  
3225 16  
GCCAGCCATC TGTTGTTTGC CCCTCCCCCG TGCCTTCCTT GACCCTGGAA GGTGCCACTC 3300  
BOVINE GROWTH HORMONE POLYADENYLATION REGION=231bp  
CCACTGTCTT TCCTAATAA AATGAGGAAA TTGCATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGTCATT 3360  
CTATTCTGGG GGGTGGGGTG GGGCAGGACA GCAAGGGGGA GGATTGGGAA GACAATAGCA 3420  
GGCATGCTGG GGATGCGGTG GGCTCTATGG AACCAGCTGG GGCTCGACAG CGCTGGATCT 3480  
3456 17 LINKER #8=34bp  
CCCGATCCCC AGCTTTGCTT CTCAATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAAAT 3540  
3490 1  
AATTTTAAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAAG GATGCTTTAG 3600  
MOUSE BETA GLOBIN MAJOR PROMOTER=366bp  
AGACAGTGT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTATTCA GAGGGAGTAC CCAGAGCTGA 3660  
GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 3720  
GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 3780  
GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 3840  
CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATAG CTTGGACAGC TCAGGGCTGC GATTTGCGGC 3900  
3856 17 LINKER #9=19bp 5' UNTRANSLATED DHFR=82bp  
CAAACCTGAC GGCAATCCTA GCGTGAAGGC TGGTAGGATT TTATCCCCGC TGCCATCATG 3960  
3957 18 START DHFR  
GTTGACCAT TGAAGTGCAT CGTCGCCGTG TCCAAAATA TGGGGATTGG CAAGAACGGA 4020  
GACCTACCCT GGCTCCGCT CAGGAACGAG TTCAAGTACT TCCAAAGAAT GACCACAACC 4080  
TCTTCAGTGG AAGGTAACA GAATCTGGTG ATTATGGGTA GGAAAACCTG GTTCTCCATT 4140  
MOUSE DHFR=564bp=187 AMINO ACID & STOP CODON  
CCTGAGAAGA ATCGACCTTT AAAGGACAGA ATTAATATAG TTCTCAGTAG AGAACTCAAA 4200  
GAACCACCAC GAGGAGCTCA TTTTCTTGCC AAAAGTTTGG ATGATGCCTT AAGACTTATT 4260  
GAACAACCGG AATTGGCAAG TAAAGTAGAC ATGGTTTGGG TAGTCGGAGG CAGTTCTGTT 4320  
TACCAGGAAG CCATGAATCA ACCAGGCCAC CTTAGACTCT TTGTGACAAG GATCATGCAG 4380  
GAATTTGAAA GTGACACGTT TTTCCCAGAA ATTGATTTGG GGAAATATAA ACTTCTCCCA 4440  
GAATACCCAG GCGTCCTCTC TGAGGTCCAG GAGGAAAAAG GCATCAAGTA TAAGTTTGAA 4500

2C. ábra

GTCTACGAGA AGAAAGACTA SCAGGAAGAT GCTTTCAAGT TCTCTGCTCC CCTCCTAAAG 4560  
4521 2

3' UNTRANSLATED DHFR=82bp LINKER #10=10bp  
TCATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGATCAGCTT CGACTGTCTC 4620  
4603 4 4613 4

TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCCC CTCCCCCGTG CCTTCCTTGA CCCTGGAAGG 4680

BOVINE GROWTH HORMONE POLYADENYLATION REGION=231bp  
TGCCACTCCC ACTGTCCCTT CCTAATAAAA TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG 4740

GTGTCATTCT ATTCTGGGGG GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800

CAATAGCAGG CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGAA CCAGCTGGGG CTCGAGCTAC 4860  
4844 5 LINKER #11=17bp

TAGCTTTGCT TCTCAATTC TATTTCAT AATGAGAAAA AAAGGAAAAT TAATTTAAC 4920

ACCAATTCAG TAGTTGATTG AGCAAATGCG TTGCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4980

MOUSE BETA GLOBIN MAJOR PROMOTER=366bp  
TCTCTGCACA GATAAGGACA AACATTATTC AGAGGGAGTA CCCAGAGCTG AGACTCCTAA 5040

GCCAGTGAGT GGCACAGCAT TCTAGGGAGA AATATGCTTG TCATCACCGA AGCCTGATTC 5100

CGTAGAGCCA CACCTTGGTA AGGGCCAATC TGCTCACACA GGATAGAGAG GGCAGGAGCTC 5160

AGGGCAGAGC ATATAAGGTG AGGTAGGATC AGTTGCTCCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220

LINKER #12=21bp START NEO  
TTGTTGGG AGCTTGGATC GATCCTCTAT GTTGAACAA GATGGATTGC ACGCAGGTTC 5280  
5227 8 5248 9

TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA GGCTATTGGG CTATGACTGG GCACAACAGA CAATCGGCTG 5340

CTCTGATGCC GCCGTGTTCC GGCTGTCAGC GCAGGGGCGC CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC 5400

NEOMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE  
CGACCTGTCC GGTGCCCTGA ATGAAGTCA GGACGAGGCA GCGCGGCTAT CGTGGCTGGC 5460

795bp=264 AMINO ACIDS & STOP CODON  
CACGACGGGC GTTCCTTGCG CAGCTGTGCT CGACGTTGTC ACTGAAGCGG GAAGGGACTG 5520

GCTGCTATTG GGCGAAGTGC CCGGGCAGGA TCTCCTGTCA TCTCACCTTG CTCCTGCCGA 5580

GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT ACGCTTGATC CGGCTACCTG 5640

CCCATTGAC CACCAAGCGA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGGAAAGCCG 5700

TCTTGTCGAT CAGGATGATC TGGACGAAGA GCATCAGGGG CTCGCGCCAG CCGAACTGTT 5760

CGCCAGGCTC AAGGCGCGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC GTCGTGACCC ATGGCGATGC 5820

CTGCTTGCCG AATATCATGG TGGAAAATGG CCGCTTTTCT GGATTCATCG ACTGTGGCCG 5880

GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT ACCCGTGATA TTGCTGAAGA 5940

GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTTCT CGTGCTTTAC GGTATCGCCG CTTCCCGATTC 6000

2D. ábra

GCAGCGCATC GCCTTCTATC GCCTTCTTGA <sup>STOP NEO!</sup> CGAGTTCTTC TGAGCGGGAC TCTGGGGTTC 6060  
604314

GAAATGACCG ACCAAGCGAC GCCCAACCTG CCATCAGAG ATTTCGATTC CACCGCCGCC 6120

TTCTATGAAA GGTGGGGCTT <sup>3' UNTRANSLATED NEO=173bp</sup> CGGAATCGTT TTCCGGGACG CCGGCTGGAT GATCCTCCAG 6180

CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCCAACT <sup>621617</sup> TGTTTATTGC AGCTTATAAT 6240

GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAT TTCACAAATA AAGCATTITT TTCACTGCAT 6300

TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA <sup>SV40 POLY A EARLY=133bp</sup> ACTCATCAAT CTATCTTATC ATGCTGGAT <sup>LINKER #13=19bp</sup> CGCGGCCGC 6360  
6349150

ATCCCGTGA <sup>636819</sup> GAGCTTGGCG TAATCATGGT CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC 6420

CGCTCACAAT TCCACACAAC ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCCT 6480

AATGAGTGAG CTAACTCACA TTAATTGCGT TCGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA 6540

ACCTGTCTGT CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC GGTTTGCCTA 6600

TTGGGCGCTC <sup>PVC 19</sup> TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC 6660

GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG 6720

CAGGAAAGAA CATGTGAGCA AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT 6780

TGCTGGCGTT <sup>6792=BACTERIAL ORIGIN OF REPLICATION</sup> TTCCATAGG CTCCGCCCCCTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCA 6840

GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GCGTTTTCCC CCTGGAAGCT 6900

CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG ATACCTGTCC GCCTTTCTCC 6960

CTTCGGGAAG CGTGGCGCTT TCTCAATGCT CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG 7020

TCGTTGCTC CAAGCTGGGC TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT 7080

TATCCGGTAA CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG 7140

CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA GAGTTCTTGA 7200

AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GGACAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA 7260

AGCCAGTTAC CTTCGGAAAA AGAGTTGGTA GCTCTTGATC CGGCAAAACA ACCACCGCTG 7320

GTAGCGGTGG TTTTTTTGTT TGCAAGCAGC AGATTACGCG CAGAAAAAAA GGATCTCAAS 7380

AAGATCCTTT GATCTTTTCT ACGGGGTCTG ACGCTCAGTG GAACGAAAAC TCACGTTAA 7440

GGATTTTGGT CATGAGATTA TCAAAAAGGA TCTTCACCTA GATCCTTTTA AATTAAAAAT 7500

2E. ábra

GAAGTTTTAA ATCAATCTAA AGTATATATG **STOP BETA LACTAMASE** | **TACCAATGCT** 756C  
| 7550  
TAATCAGTGA GGCACCTATC TCAGCGATCT GTCTATTTTCG TTCATCCATA GTTGCCTGAC 762C  
TCCCCGTCGT GTAGATAACT ACGATACGGG AGGGCTTACC ATCTGGCCCC AGTGCTGCAA 768C  
TGATACCGCG AGACCCACGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAAC CAGCCAGCCG 774C  
GAAGGGCCGA GCGCAGAAGT **BETA LACTAMASE=861bp** CTCCATCCAG TCTATTAATT 780C  
**286 AMINO ACID & STOP CODON**  
GTTGCCGGGA AGCTAGAGTA AGTAGTTCGC CAGTTAATAG TTTGCGCAAC GTTGTGCCC4 786C  
TTGCTACAGG CATCGTGGTG TCACGCTCGT CGTTTGGTAT GGCTTCATTC AGCTCCGGTY 792C  
CCCAACGATC AAGGCGAGTT ACATGATCCC CCATGTTGTG CAAAAAAGCG GTTAGCTCCT 798C  
TCGGTCCTCC GATCGTTGTC AGAAGTAAGT TGGCCGCAGT GTTATCACTC ATGGTTATGG 804C  
CAGCACTGCA TAATTCTCTT ACTGTCATGC CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGTG 810C  
AGTACTCAAC CAAGTCATTC TGAGAATAGT GTATGCGGCG ACCGAGTTGC TCTTGCCCGG 816C  
CGTCAATACG GGATAATACC GCGCCACATA GCAGAACTTT AAAAGTGCTC ATCATTGGAA 822C  
AACGTTCTTC GGGGCGAAAA CTCTCAAGGA TCTTACCGCT GTTGAGATCC AGTTCGATGT 828C  
AACCCACTCG TGCACCCAAC TGATCTTCAG CATCTTTTAC TTTACCAGC GTTTCTGGGT 834C  
GAGCAAAAAC AGGAAGGCAA AATGCCGCAA AAAAGGGAAT AAGGGCGACA CGGAAATGTT 840C  
**START BETA LACTAMASE**  
GAATACT**CAT** ACTCTTCCTT TTTCAATATT ATTGAAGCAT TTATCAGGGT TATTGTCTCA 846C  
| 8410  
TGAGCGGATA CATATTTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGCGCACAT 852C  
TTCCCCGAAA AGTGCCACCT

2F. ábra

LINKER #1=15bp  
 GACGTCCGG CCGCTCTAGG CCTCCAAAA AGCCTCCTCA CTA<sup>15</sup>CTCTCG AATAGCTCAG 60

AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGCATAAA TAAAAAAAT TAGTCACCC- TGCATGGGG. 120

SV40 ORIGIN=332bp  
 GGAGAATGGG CGGA<sup>332</sup>ACTGGG CGGAGTTAGG GCGGGGATGG GCGGAGTTAG GGGCGGGACT 180

ATGGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATGCTT TGCATACTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGGG 240

GACTTTCCAC ACCTGGTTGC TGA<sup>332</sup>CTAATTG AGATGCATGC TTTGCATACT TCTGCCTGCT 300

GGGGAGCCTG GGGACTTTCC ACACCCTAAC TGACACACAT TCCACAG<sup>332</sup>AAT TAATTCCCCT 360

LINKER #2=13bp  
 AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCCGC 420

GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCCT GGCTGACCGC CCAACGACCC CCGCCATTG 480

ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA ACGCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540

CVM PROMOTER-ENHANCER=567bp  
 TGGGTGGACT ATTTACGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA 600

AGTACGCCCC CTATTGACGT CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TGGCCAGTAC 660

ATGACCTTAT GGGACTTTCC TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC 720

ATGGTGATGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCGTGGAT AGCGGTTTGA CTCACGGGGA 780

TTTCCAAGTC TCCACCCCAT TGACGTCAAT GGGAGTTTGT TTTGGCACCA AAATCAACGG 840

GACTTTCCAA AATGTCGTAA CAACTCCGCC CCATTGACGC AAATGGGCGG TAGGCGTGTA 900

LINKER #3=7bp  
 CGGTGGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTGAACC GTCAGATCGC CTGGAGACGC 960

Bgl 2 | START LIGHT CHAIN NATURAL LEADER=66bp  
 CATCACAGAT CTCTCACTAT GGATTTTCAG GTGCAGATTA TCAGCTTCCT GCTAATCAGT 1020

GCTTCAGTCA TAATGTCCAG AGGACAAATT GTTCTCTCCC AGTCTCCAGC AATCCTGTCT 1030

GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TGCAGGGCCA GCTGAAGTGT AAGTTACATC 1140

CACTGGTTCC AGCAGAAGCC AGGATCCTCC CCCAAACCCT GGATTTATGC CACATCCAAC 1200

LIGHT CHAIN VARIABLE REGION 318bp 106 AMINO ACID  
 CTGGCTTCTG GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGGT CTGGGACTTC TFACTCTCTC 1260

ACCATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTATT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT 1320

AACCCACCCA CGTTCGGAGG GGGGACCAAG CTGGAAATCA AACGTACGGT GGCTGCACCA 1380

TCTGTCTTCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACGGC CTCTGTTGTG 1440

TGCCTGCTGA ATA<sup>1382</sup>ACTTCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGGT GGATAACGCC 1500

3A. ábra

HUMAN KAPPA CONSTANT=324bp=107 AMINO ACID & STOP CODON  
CTCCAATCGG GTAACCTCCA GGAGAGTGTC ACAGAGCAGG ACAGCAAAGA CAGCACCTAC 1560  
AGCCTCAGCA GCACCCTGAC GCTGAGCAAA GCAGACTAGG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1620  
TGCGAAGTCA CCCATCAGGG CCTGAGCTCG CCCGTCACAA AGAGCTTCAG CAGGGGAGAG 1680  
STOP  
LIGHT  
CHAIN|Eco RI LINKER #4=81bp  
TGTTCGATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACCTAGA CTGGATTCTG GACAACATGC 1740  
1646 17  
GGCCGTGATA TCTACGTATG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1800  
1771 12  
GTTTGCCCT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC TGTCCTTTCC 1860  
TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1920  
BOVINE GROWTH HORMONE POLYADENYLATION REGION=231bp  
GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT 1980  
CGGGTGGGCT CTATGGAACC AGCTGGGGCT CGACAGCTAT GCCAAGTACG CCCCCTATTG 2040  
2002 13 2017 8  
ACGTCAATGA CCGTAAATGG CCCGCCTGGC ATTATGCCCA GTACATGACC TTATGGGACT 2100  
TTCCTACTTG GCAGTACATC TACGTATTAG TCATCGCTAT TACCATGGTG ATGCGGTTTT 2160  
CMV PROMOTER-ENHANCER=334bp  
GGCAGTACAT CAATGGGCGT GGATAGCGGT TTAGCTCACG GGGATTCCA AGTCTCCACC 2220  
CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTTTTGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAATGTC 2280  
GTAACAACCTC CGCCCCATTG ACGCAAATGG GCGGTAGGCG TGTACGGTGG GAGGTCTATA 2340  
LINKER #6=7bp Sal I  
TAAGCAGAGC TGGGTACGTC CTCACATTCA GTGATCAGCA CTGAACACAG ACCCGTCCAC 2400  
2351 12 2358 9  
START  
HEAVY CHAIN SYNTHETIC & NATURAL LEADER Mlu I 2457 18  
ATGGGTTGGA GCCTCATCTT GCTCTTCCTT GTCGCTGTTG CTACGGCTGT CCTGTCCAG 2460  
2401 -5 -4 -3 -2 -1 +1  
GTACAACCTGC AGCAGCCTGG GGCTGAGCTG GTGAAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC 2520  
TGCAAGGCTT CTGGCTACAC ATTTACCAGT TACAATATGC ACTGGGTAAA ACAGACACCT 2580  
HEAVY CHAIN VARIABLE=363bp=121 AMINO ACID  
GGTCGGGGCC TGGAATGGAT TGGAGCTATT TATCCCGGAA ATGGTGATAC TTCCTACAAT 2640  
CAGAAGTTCA AAGGCAAGGC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG 2700  
CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ATCGACTTAC 2760  
TACGGCGGTG ACTGGTACTT CAATGTCTGG GCGGCAGGGA CCACGGTCAC CGTCTCTGCA 2820  
Nhe I  
GCTAGCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCTT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG 2880  
GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCG 2940  
HUMAN GAMMA 1 CONSTANT=993bp  
TGGAACTCAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCA 3000

3B. ábra

330 AMINO ACID & STOP CODON  
GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC 3060  
TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAATA AGCAGAGCCC 3120  
AAATCTTGTG ACAAAACTCA CACATGCCCA CCGTGCCAG CACCTGAACT CCTGGGGGGA 3180  
CCGTCAGTCT TCCTCTTCCC CCCAAAACCC AAGGACACCC TCATGATCTC CCGGACCCCT 3240  
GAGGTCACAT GCGTGGTGGT GGACGTGAGC CACGAAGACC CTGAGGTCAA GTTCAACTGG 3300  
TACGTGGACG GCGTGGAGGT GCATAATGCC AAGACAAAGC CGCGGGAGGA GCAGTACAAC 3360  
AGCACGTACC GTGTGGTCAG CGTCCTCACC GTCCTGCACC AGGACTGGCT GAATGGCAAG 3420  
GAGTACAAGT GCAAGGTCTC CAACAAAGCC CTCCCAGCCC CCATCGAGAA AACCATCTCC 3480  
AAAGCCAAAG GGCAGCCCCG AGAACCACAG GTGTACACCC TGCCCCATC CCGGGATGAG 3540  
CTGACCAAGA ACCAGGTCAG CCTGACCTGC CTGGTCAAAG GCTTCTATCC CAGCGACATC 3600  
GCCGTGGAGT GGGAGAGCAA TGGGCAGCCG GAGAACAAC ACAAGACCAC GCCTCCCGTG 3660  
CTGGACTCCG ACGGCTCCTT CTTCCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGGTGG 3720  
CAGCAGGGGA ACGTCTTCTC ATGCTCCGTG ATGCATGAGG CTCTGCACAA CCACTACACG 3780  
CAGAAGAGCC TCTCCCTGTC TCCGGGTAAA TGAGGATCCG TTAACGGTTA CCAACTACCT 3840  
AGACTGGATT CGTGACAACA TGGCGCCGTG ATATCTACGT ATGATCAGCC TCGACTGTGC 3900  
CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC CCTCCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG 3960  
GTGCCACTCC CACTGTCCTT TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA 4020  
BOVINE GROWTH HORMONE POLYADENYLATION REGION=231bp  
GGTGTCAATC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG 4080  
ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGGA ACCAGCTGGG GCTCGACAGC 4140  
GCTGGATCTC CCGATCCCCA GCTTTGCTTC TCAATTTCTT ATTTGCATAA TGAGAAAAAA 4200  
AGGAAAATTA ATTTAACAC CAATTCAGTA GTTGATTGAG CAAATGCGTT GCCAAAAGG 4260  
MOUSE BETA GLOBIN MAJOR PROMOTER=366bp  
ATGCTTTAGA GACAGTGGTC TCTGCACAGA TAAGGACAAA CATTATTCAG AGGGAGTACC 4320  
CAGAGCTGAG ACTCCTAAGC CAGTGAGTGG CACAGCATTG TAGGGAGAAA TATGCTTGTC 4380  
ATCACCGAAG CCTGATTCCG TAGAGCCACA CCTTGGTAAG GGCCAATCTG CTCACACAGG 4440  
ATAGAGAGGG CAGGAGCCAG GGCAGAGCAT ATAAGGTGAG GTAGGATCAG TTGCTCCTCA 4500

3C. ábra

CATTTCCTC TGACATAGTT **LINKER #9=19bp** 5' UNTRANSLATED DHFR=82bp  
 GTGTTGGGAG CTTGGATAGC TTGGACAGCT CAGGGCTGCC 4560  
 4525 6 4544 5  
 ATTTCCGCCC AAACCTGACG GCAATCCTAG CGTGAAAGGT GGTAGGATT TATCCCCGCT 4620  
**START DHFR**  
 GCCATCCTCG TTCGACCATT GAACTGCATC GTCGCCGTGT CCCAAAATAT GGGGATTGGC 4680  
 4626 7  
 AAGAACGGAG ACCTACCCTG GCCTCCGCTC AGGAACGAGT TCAAGTACTT CCAAAGAATG 4740  
 ACCACAACCT CTTCAGTGGG AGGTAAACAG AATCTGGTGA TTATGGGTAG GAAAACCTGG 4800  
**DHFR=564bp=187 AMINO ACID & STOP CODON**  
 TTCTCCATTC CTGAGAAGAA TCGACCTTTA AAGGACAGAA TTAATATAGT TCTCAGTAGA 4860  
 GAACTCAAAG AACCACCACG AGGAGCTCAT TTTCTTGCCA AAAGTTTSGA TGATGCCTTA 4920  
 AGACTTATTG AACAAACCGG ATTGGCAAGT AAAGTAGACA TGGTTTGGAT AGTCGGAGGC 4980  
 AGTTCTGTTT ACCAGGAAGC CATGAATCAA CCAGGCCACC TTAGACTCTT TGTGACAAGG 5040  
 ATCATGCAGG AATTGAAAG TGACACGTTT TTCCAGAAA TTGATTTGGG GAAATATAAA 5100  
 CTTCTCCCAG AATACCCAGG CGTCCTCTCT GAGGTCCAGG AGGAAAAAGG CATCAAGTAT 5160  
**STOP DHFR** 3' UNTRANSLATED DHFR=82bp  
 AAGTTTGAAG TCTACGAGAA GAAAGACTAA CAGGAAGATG CTTTCAAGTT CTCTGCTCCC 5220  
 5140 1  
 CTCCTAAAGC TATGCATTTT TATAAGACCA TGGGACTTTT GCTGGCTTTA **LINKER #10**  
 GATCAGCCTC 5280  
 5272 3  
**=10bp**  
 GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTTGCCCC TCCCCGTGC CTTCTTTGAC 5340  
**BOVINE GROWTH HORMONE POLYADENYLATION=231bp**  
 CCTGGAAGGT GCCACTCCCA CTGTCCTTTC CTAATAAAAT GAGGAAATTG CATCGCATTG 5400  
 TCTGAGTAGG TGTCATTCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA 5460  
**LINKER #11**  
 TTGGGAAGAC AATAGCAGGC ATGCTGGGGA TCGGGTGGGC TCTATGGAAC CACTGGGGC 5520  
 5513 4  
**=17bp**  
 TCGAGCTACT AGCTTTGCTT CTCAATTJCT TATTTGCATA ATGAGAAAAA AAGGAAAATT 5580  
 5530 1  
 AATTTAACA CCAATTCAGT AGTTGATTGA GCAAATGCGT TGCCAAAAGG GATGCTTTAG 5640  
**MOUSE BETA GLOBIN MAJOR PROMOTER=366bp**  
 AGACAGTGT CTCTGCACAG ATAAGGACAA CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5700  
 GACTCCTAAG CCAGTGAGTG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTTGT CATCACCGAA 5760  
 GCCTGATTCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAATCT GCTCACACAG GATAGAGAGG 5820  
 GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGGTGA GGTAGGATCA GTTGCTCCTC ACATTTGCTT 5880  
**LINKER #12=21bp** **START NEO**  
 CTGACATAGT TGTGTTGGGA GCTTGGATCG ATCCTCTGTT GTTGAACAAG ATGGATTGCA 5940  
 5896 7 5917 8  
 CGCAGTTCT CCGGCCGCTT GGGTGGAGAG GCTATTCGGC TATGACTGGG CACAACAGAC 6000

3D. ábra

AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCGG GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC C3GTTCTTTT 6060  
NEOMYCIN PHOSPHOTRANSFERASE=795bp=264 AMINO ACID & STOP CODON  
TGTC AAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAC TGCAG GACGAGGCAG C3CGGCTATC 6120  
GTGGCTGGCC ACGACGGGCG TTCCTTGCCG AGCTGTGCTC GACGTTGTC A CTGAAGCGLE: 6180  
AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGGCAGGAT CTCCTGT CAT CTCACCTTGC 6240  
TCCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCCG CGGCTGCATA CGCTTGATCC 6300  
GGCTACCTGC CCATTTCGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT 6360  
GGAAGCCGGT CTGTGCGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC 6420  
CGAACTGTTT GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT GCCCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA 6480  
TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT GGAAAATGGC CGCTTTTCTG GATTCATCGA 6540  
CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT 6600  
TGCTGAAGAG CTTGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC 6660  
TCCCGATTCC CAGCGCATCG CCTTCTATCG CCTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGGACT 6720  
STOP NEO  
6712 3  
CTGGGGTTCC AAATGACCGA CCAAGCGACG CCCAACCTGC CATCAGGAGA TTTGATTCC 6780  
3' UNTRANSLATED NEO=173bp  
ACCGCCGCCT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC CGGCTGGATG 6840  
ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCC ACCCCAACTT GTTTATTGCA 6900  
6885 6  
GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT 6960  
SV40 EARLY POLYADENYLATION REGION=133bp  
TCACTGCATT CTAGTTGTGG TTTGTCCAAA CTCATCAATC TATCTTATCA TGTCCTGGATC 7020  
7018 9  
LINKER #13=19bp  
GCGGCCGCGA TCCCGTCCGAG AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA 7080  
7037 8  
PUC 19  
ATTGTTATCC GCTCACAAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAGCCT 7140  
GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG CCCGCTTTCC 7200  
AGTCGGGAAA CCTGTGCTGC CAGCTGCATT AATGAATCGG CCAACGCGCG GGGAGAGGCG 7260  
GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTGTTT 7320  
GGCTGCGGCG AGCGGTATCA GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG 7380  
GGGATAACGC AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA 7440  
7461=BACTERIAL ORIGIN OF REPLICATION  
AGGCCGCGTT GCTGGCGTT TCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT CACAAAAATC 7500

3E. ábra

GACCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA AAGATACGAG GCGTTTCCCC 7560  
CTGG-AAGCTC CCTCGTGCGC TCTCCTGTTT CGACCCTGSC GCTTACCGGA TACCTGTCCG 7620  
CCTTCTCCC TTCGGGAAGC GTGGCGCTTT CTCAATGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT 7580  
CGGTGTAGGT CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC 7740  
GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC GACTTATCGC 7800  
CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGGC GGTGCTACAG 7860  
AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT AACTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTCCG 7920  
CTCTGCTGAA GCCAGTTACC TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAAACAAA 7980  
CCACCGCTGG TAGCGGTGGT TTTTTGTTC GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG 8040  
GATCTCAAGA AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAAC 8100  
CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG ATCCTTTTAA 8160  
ATTAATAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACAGTT 8220  
BETA LACTAMASE  
ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG 8280  
TTGCTGACT CCCCGTCGTG TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCCA 8340  
GTGCTGCAAT GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC 8400  
**BETA LACTAMASE=861bp=286 AMINO ACID & STOP CODON**  
AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC TCCATCCAGT 8460  
CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAACG 8520  
TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA 8580  
GCTCCGGTTC CCAACGATCA AGGCGAGTGA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG 8640  
TTAGCTCCTT CGGTCTCTCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGT GGCCGCAGTG TTATCACTCA 8700  
TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA TGCTTTTCTG 8760  
TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG TATGCGGCGA CCGAGTTGCT 8820  
CTTGCCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA 8880  
TCATTGGAAA ACGTTCTTCG GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940  
GGTCGATGTA ACCCACTCGT GCACCCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG 9000  
TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA AGGGCGACAC 9060  
GGAAATGTTG AATACTCATA | **START BETA LACTAMASE** CTCTTCCTTT TTCAATATTA TTGAAGCATT TATCAGGGTT 9120  
ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT 9180  
CGCGCACATT TCCCCGAAAA GTGCCACCT

3F. ábra

LEADER

```

FRAME 1 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser Va
      ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC CTG CTA ATC AGT GCT TCA GT
      987          996          1005          1014          1023

-5      -1      +1      FRI      10
Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Ser
ATA ATG TCC AGA GGA CAA ATT GTT CTC TCC CAG TCT CCA GCA ATC CTG TCT GCA TCT
      1038          1047          1056          1065          1074          1093

Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His
CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGC AGG GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATC CAC
      1095          1104          1113          1122          1131          1140

35      FR2      40      45      49      50      CDR2
Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn
TGG TTC CAG CAG AAG CCA GGA TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT GCC ACA TCC AAC
      1152          1161          1170          1179          1188          1197

55      56      57      60      FR3      65      70
Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACT TCT TAC TCT
      1209          1218          1227          1236          1245          1254

75      80      85      88      89      90
Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
CTC ACC ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG
      1266          1275          1284          1293          1302          1311

CDR3      95      97      98      100      FR4      105      107
Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
ACT AGT AAC CCA CCC ACG TTC GGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA
      1323          1332          1341          1350          1359

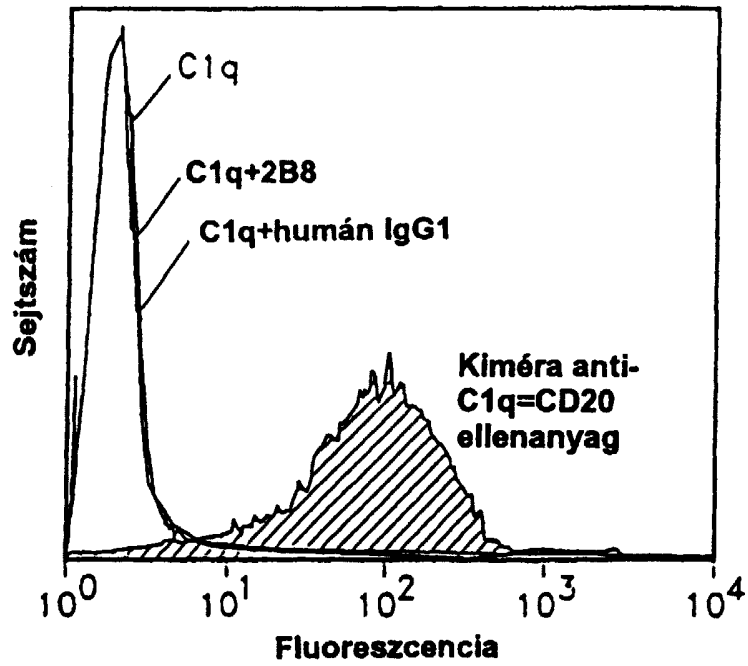
```

4. ábra

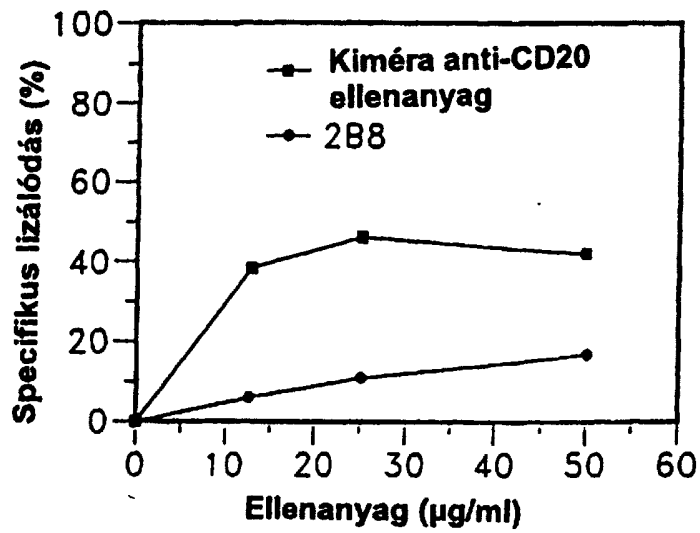
LEADER

	-19				-15					-10										-5	
FRAME 1	Met	Gly	Trp	Ser	Leu	Ile	Leu	Leu	Phe	Leu	Val	Ala	Val	Ala	Thr	Arg	Val				
	ATG	GGT	TGG	AGC	CTC	ATC	TTG	CTC	TTC	CTT	GTC	GCT	GTT	GCT	ACG	CGT	GTC				
				2409			2418		2427			2436			2445						
	-1	+1	FR1										10	15							
	Leu	Ser	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Ala	Gly	Ala	Ser		
	CTG	TCC	CAG	GTA	CAA	CTG	CAG	CAG	CCT	GGG	GCT	GAG	CTG	GTG	AAG	CCT	GGG	GCC	TCA		
			2460			2469			2478			2487			2496				2505		
			20					25					30	31	CDR1			35	36		
	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr	Asn	Met	His	Trp		
	GTG	AAG	ATG	TCC	TGC	AAG	GCT	TCT	GGC	TAC	ACA	TTT	ACC	AGT	TAC	AAT	ATG	CAC	TGG		
			2517			2526			2536			2544			2553			2562			
				40	FR2				45				49	50		52	52A	53	54		
	Val	Lys	Gln	Thr	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	Ala	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn		
	GTA	AAA	CAG	ACA	CCT	GGT	CGG	GGC	CTG	GAA	TGG	ATT	GGA	GCT	ATT	TAT	CCC	GGA	AAT		
			2574			2583			2592			2601			2610			2619			
	55		CDR2			60					65	66	FR3			70					
	Gly	Asp	Thr	Ser	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys		
	GGT	GAT	ACT	TCC	TAC	AAT	CAG	AAG	TTC	AAA	GGC	AAG	GCC	ACA	TTG	ACT	GCA	GAC	AAA		
			2631			2640			2649			2658			2667			2676			
			75				80		82	82A	82B	82C	83		85						
	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val		
	TCC	TCC	AGC	ACA	GCC	TAC	ATG	CAG	CTC	AGC	AGC	CTG	ACA	TCT	GAG	GAC	TCT	GCG	GTC		
			2688			2697			2706			2715			2724			2733			
	90			94	95	CDR3				100	100A	100B	100C	100D	101	102	103				
	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Asp	Trp	Tyr	Phe	Asn	Val	Trp	Gly		
	TAT	TAC	TGT	GCA	AGA	TCG	ACT	TAC	TAC	GGC	GGT	GAC	TGG	TAC	TTC	AAT	GTC	TGG	GGC		
			2745			2754			2763			2772			2781			2790			
	105	FR4			110			113													
	Ala	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ala												
	GCA	GGG	ACC	ACG	GTC	ACC	GTC	TCT	GCA												
			2802			2811			2820												

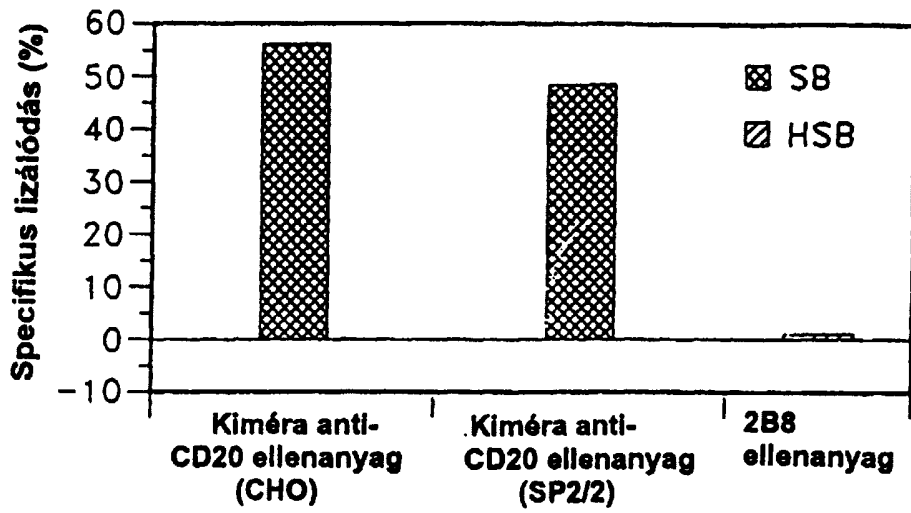
5. ábra



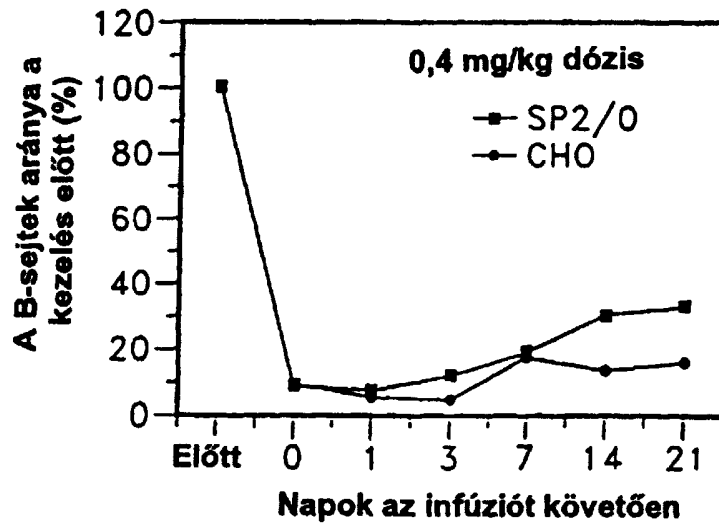
6. ábra



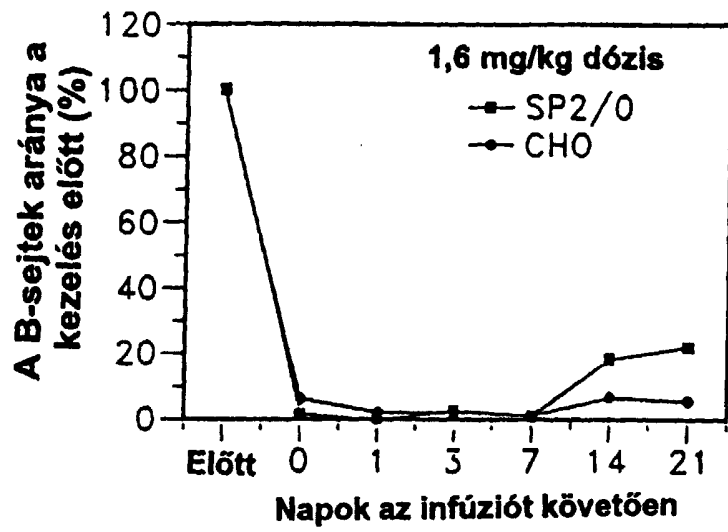
7. ábra



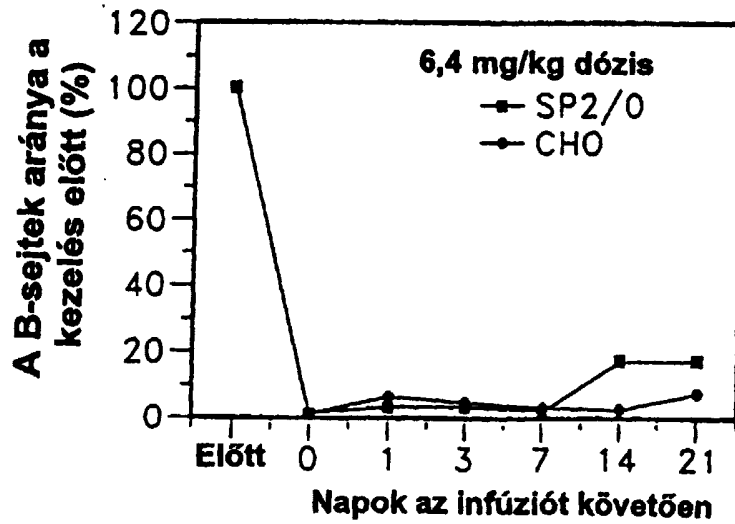
8. ábra



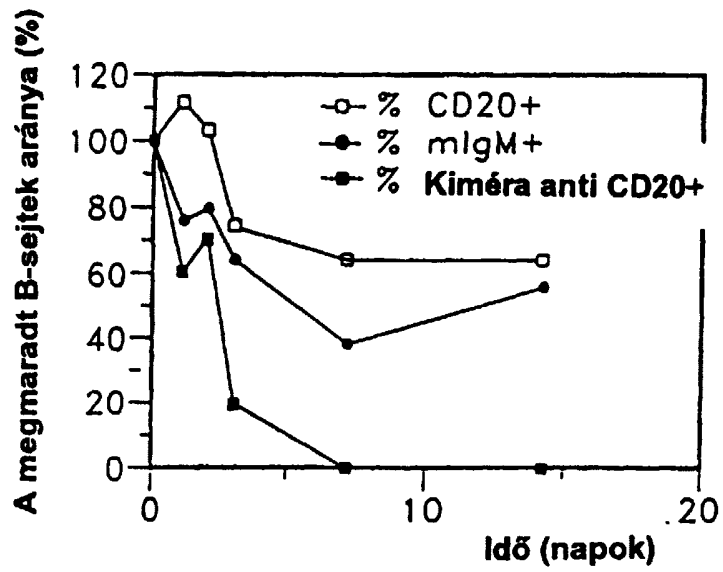
9A. ábra



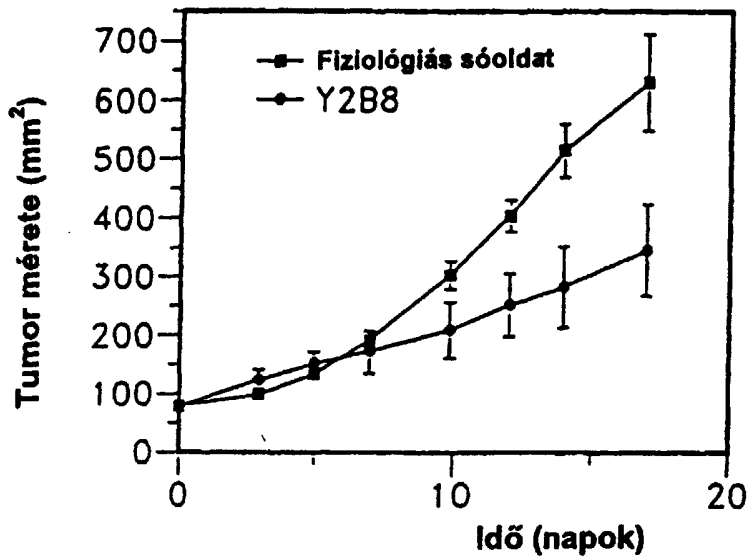
9B. ábra



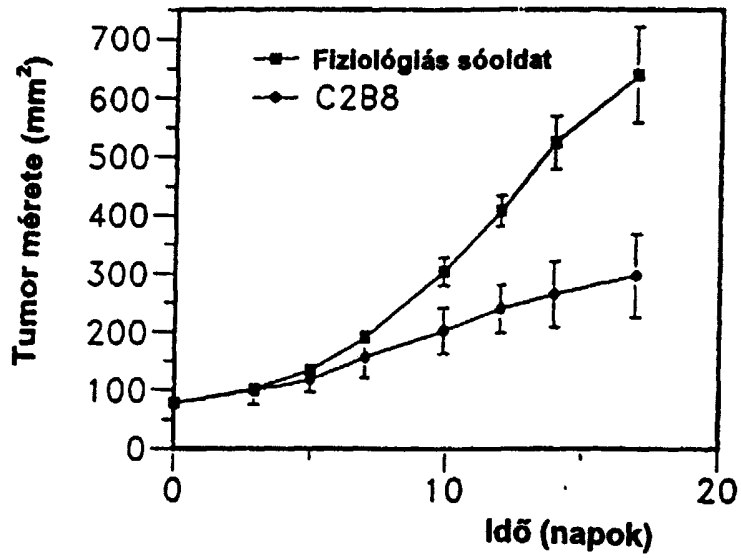
9C. ábra



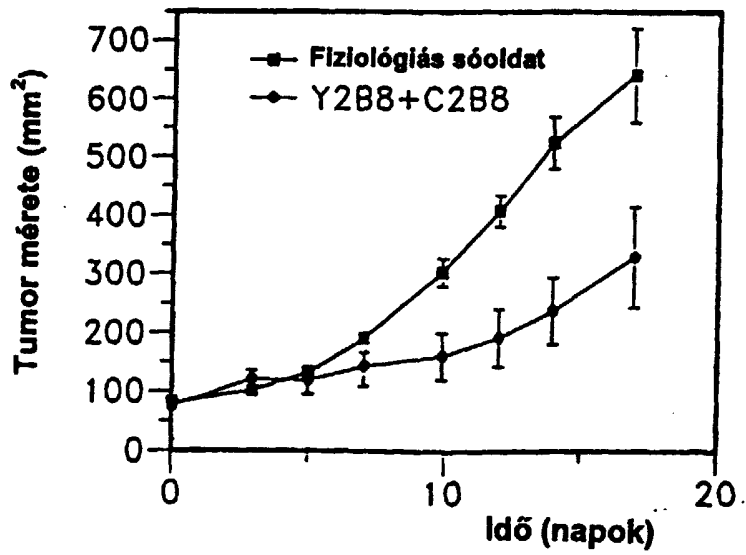
10. ábra



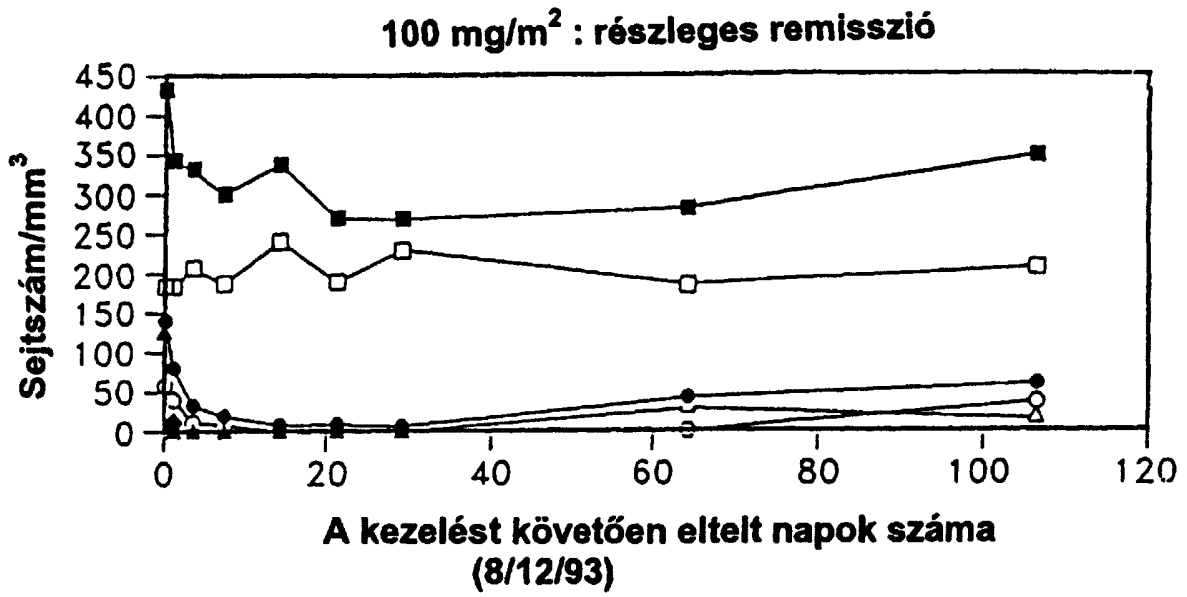
11. ábra



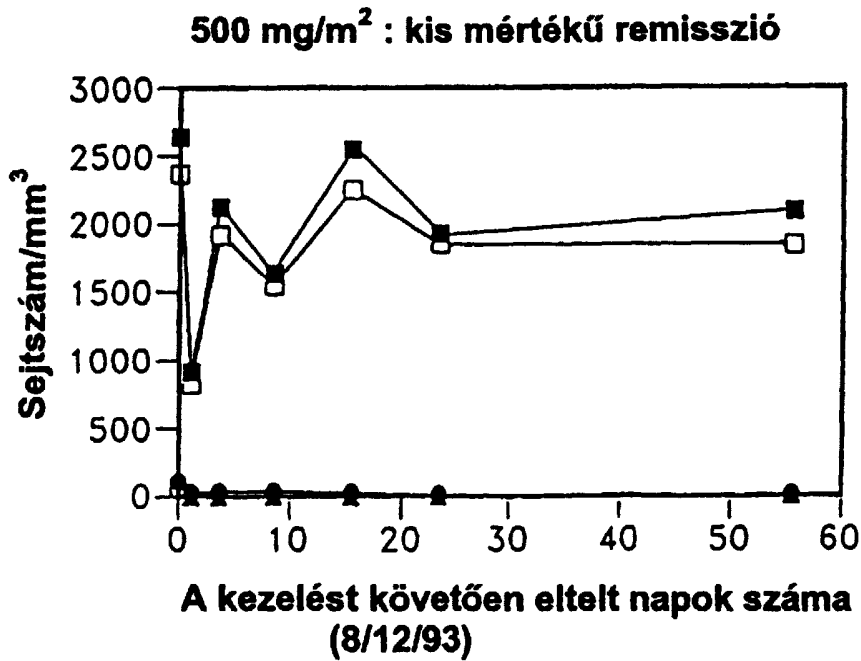
12. ábra



13. ábra



14A. ábra



14B. ábra