

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

2022

64394

HUMÁN ZÓNA PELLUCIDA ZP3 PROTEIN

AKZO N.V. Arnhem, Hollandia

A bejelentés napja: 1991. 08. 13.

Elsőbbsége: 1990.08. 27. (90202287.0) Europa

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP91/01538

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/03548

KIVONAT

A találmány humán ZP3 aktivitással vagy legalább részben humán ZP3 antigenitással rendelkező polipeptidre vagy annak funkcionálisan megfelelő származékára, valamint a polipeptid epitopjára és a polipeptid, illetve epitopja elleni anti-testre vonatkozik. A találmány kiterjed az e polipeptidet kódoló nukleinsav-szekvenciára, az ezt tartalmazó vektorra és a vektorral transzformált gazdaszervezetre. A találmány szerinti polipeptid vakcina és diagnosztikai készlet előállítására használható. A vakcina hatásos fogamzásgátlószereként alkalmazható.

Jell. d'bra 0

Bacsi Z.

**KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY**

2022

64394

Képviselő:

DANUBIA SZABADALMI ÉS VÉDJEGY IRODA KFT.

HUMÁN ZÓNA PELLUCIDA ZP3 PROTEIN

AKZO N.V. Arnhem, Hollandia

Feltaláló:

VAN DUIN Marcel, Hertogenbosch, Hollandia

A bejelentés napja: 1991. 08. 13.

Elsőbbsége: 1990. 08. 27. (90202287.0) Europa

A nemzetközi bejelentés száma: PCT/EP91/01538

A nemzetközi közzététel száma: WO 92/03548

A találmány tárgyát humán ZP3 aktivitással vagy - legalább részben - humán ZP3 antigenitással rendelkező polipeptid vagy annak funkcionálisan megfelelő származéka képezi.

76899-760-GI

A megtermékenyítési folyamat során az emlős ivarsejtek közötti első kölcsönhatást a spermiumoknak a női ivarsejtet körülvevő zóna pellucidában (ZP) található fajspecifikus receptorhoz való kötődése közvetíti. A ZP egy a sejten kívüli állomány, amely három, a ZP1, ZP2 és ZP3-nak nevezett glikoproteint tartalmaz, melyek közül a ZP3-t azonosították spermium-receptorként [Wassarman, Development, 108, 1-17 (1990)].

Számos, mind sertés, mind egér ZP proteineken végzett in vitro és in vivo tanulmány arra utal, hogy a ZP3 az immunkontracepció kifejlesztését célzó kísérleti stratégiák fontos cél-antigén jelöltje lehet [Henderson és munkatársai, J. Reprod. Fert., 83, 325-343 (1988); és a benne foglalt irodalmi helyekre vonatkozó hivatkozások]. A nemrégén végzett egér petefészek cDNS expressziós génkönyvtár anti-egér ZP3 ellenanyaggal való vizsgálata segítségével az egér ZP3 cDNS klónozása és jellemzése fontos lépést jelentett a fenti cél elérése felé [Ringuette és munkatársai, Developmental Biology, 127, 287-295 (1988)]. Ezt követően ZP3 cDNS próbákat használtak a megfelelő ZP3 kromoszomális DNS izolálására [Chamberlin és Dean, Developmental Biology, 131, 207-214 (1988); Kinloch és munkatársai, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 6409-6413 (1989)].

A ZP3 fogamzásgátló célra való felhasználásának lehetőségét hangsúlyozták azok a tanulmányok, amelyek nőstény egekben hosszú ideig tartó infertilitást mutattak egy egér ZP3 aminosav-szekvenciájából származó oligopeptiddel való vakcinázást követően [Millar és munkatársai, Science, 246,

935-938 (1989)].

Emberben immunfogamzásgátló célra egér polipeptidek nem alkalmasak, mivel a ZP3 spermium-receptor fajspecifikus. Ezenkívül, nemhumán eredetű polipeptidek nemkívánatos immunválaszt váltanak ki emberben. Ezért, egy a humán spermium-receptoron (vagy egy részén) alapuló biztonságos és hatékony fogamzásgátló vakcina kifejlesztéséhez az kell, hogy a humán ZP3 polipeptidről nyert információk, illetve a humán ZP3 polipeptid rendelkezésre álljanak.

Női ivarsejtekből elégséges mennyiségű humán ZP3 polipeptid izolálása természetesen nem lehetséges. Sikerült azonban a humán gént azonosítanunk, és szekvenciáját tisztáznunk. Ez megnyitotta a lehetőséget ZP3 polipeptidek és/vagy ZP3 polipeptid fragmensek rekombináns DNS technológiával vagy szilárd fázisú polipeptid szintézissel történő előállítására

A találmány tárgyát tehát egy a humán ZP3 polipeptid legalább egy részét kódoló új rekombináns DNS molekula képezi. Az említett DNS-molekula a 2. ábra szerinti szekvencia legalább egy részét tartalmazza.

A találmány ugyancsak kiterjed egy az említett DNS molekula legalább egy része által kódolt polipeptidre. Az említett polipeptid tartalmazhatja a 2. ábra szerinti aminosav-szekvencia legalább egy részét.

Természetesen, a találmány szerinti polipeptidek funkcionálisan megfelelő származékai, valamint fragmensei szintén a találmány tárgykörébe tartoznak.

Funkcionálisan megfelelő származékokon olyan polipepti-

deket értünk, amelyekben egy, vagy több aminosavat kémiaiilag hasonlóval helyettesítettünk.

A lényeg természetesen az, hogy ezek továbbra is humán ZP3 antigenitást mutassanak. Ez azt jelenti, hogy (lehetőség szerint adjuvánssal való) adagolásukkor humán ZP3-t felismerő ellenanyagok képződjenek.

A találmány szerinti polipeptidek szintetikusán vagy rekombináns DNS technológiával állíthatók elő. Szintetikus polipeptidek előállítására szolgáló eljárások jól ismertek a gyakorlatban, és nem igényelnek további tárgyalást.

Polipeptidek előállítása rekombináns DNS technológiával általánosan ismert eljárás, amely azonban sok, némileg különböző eredményhez vezető lehetőséget rejt. Az expresszálandó polipeptidet egy DNS szekvencia, vagy pontosabban, egy nukleinsav-szekvencia kódolja. Ennek a nukleinsav-szekvenciának kell átíródnia (opcionálisan) és transzlálódnia a kívánt polipeptiddé. Ahhoz, hogy elérjük ezt a célt, a nukleinsav-szekvenciát általában egy vektorba klónozzuk, amellyel egy gazdasejtet transzformálunk. A vektor képes lehet önreplikációra, vagy beépülhet a gazdasejt DNS-ébe.

Különböző gazdasejtek különböző polipeptidekhez vezetnek. A prokariótákból hiányzanak a glikozilezéshez szükséges organelumok. Az általuk termelt polipeptidek nem fognak szénhidrát oldalláncokat tartalmazni. Az eukarióta sejtek rendelkeznek a glikozilezéshez szükséges képességgel, azonban az élesztősejtek az emlős sejtektől eltérő glikozilációt eredményeznek.

A találmány szerinti polipeptidek szempontjából előnyös

expressziós vektor rendszer az, amely a "legtermészetesebb" glikozilációs mintát adja. Ennek elérésére az emlős sejtek a legelőnyösebbek.

A humán ZP3 polipeptiden olyan epitopokat is azonosítottunk, amelyek fogamzásgátló hatással rendelkezhetnek. Ezek az epitopok tartalmazzák a következő szekvenciák egyikének legalább egy részét:

-ThrLeuMetValMetValSerLys-,
 -SerArgArgGlnProHisValMetSerGln-,
 -GluValGlyLeuHisGluCysGlyAsnSerMetGlnValThrAspAspAlaLeu-,
 -PheSerLeuArgLeuMetGluGluAsnTrpAsnAlaGluLysArgSerProThrPhe-,
 -CysGlyThrProSerHisSerArgArgGlnProHisValMetSerGlnTrpSer-,
 vagy
 -SerGlnTrpSerThrSerAlaSerArgAsnArgArgHisValThrGluGluAla
 AspValCysValGlyAlaThrAspLeuProGlyGlnGluTrp-.

Az ezekhez hasonló kis méretű polipeptidek könnyebben előállíthatók szintetikusan. Összekapcsolhatók azonos vagy különböző "epitopokkal" is, hogy nagyobb, jobb antigén-tulajdonságú polipeptidet kapjunk.

A találmány szerinti összes polipeptid kidolgozásának egyik célja, hogy felhasználásukkal fogamzásgátló vakcinát állítsunk elő. A vakcinázás történhet passzív vagy aktív immunizálással.

Aktív immunizálás céljára a találmány szerinti polipeptidet (esetleg egy adjuvánssal) adagoljuk a női szervezetbe. Az adagolás a női szervezetben immunválaszhoz vezet. Olyan

ellenanyagok képződnek, amelyek felismerik a petesejten a humán ZP3-t. Ezek az ellenanyagok fajlagosan a spermium receptor kötőhelyéhez kötődnek, és így a spermiumok nem képesek ide kötődni, vagy az ellenanyagok ezt a kötődést térbeli gátlás révén megakadályozzák.

A passzív immunizálás lényege alapjaiban azonos. Az antigén vagy ennek utánpótlása helyett az ellene termelt ellenanyagokat közvetlenül adagoljuk. Így a találmány szerinti polipeptidek ellen kell ellenanyagokat termelnünk.

Ez elérhető egy megfelelő emlős aktív immunizációs sémájával. Az emlős B-limfocitáit megfelelő idő múlva összegyűjtjük, és fúzióval vagy transzformációval folyamatos növekedésűvé tesszük. Az erre szolgáló eljárások jól ismertek a gyakorlatban. Az ellenanyagok a folyamatos növekedésűvé tett limfociták tenyészetéből izolálhatók.

Van egy probléma azonban az állati eredetű ellenanyagokkal. Ismételt adagoláskor az immunizált nőben anti-ellenanyag választ váltanak ki. Ezért előnyös humanizált ellenanyagok használata, vagy ellenanyagok kis részleteinek használata, amelyek nem váltanak ki immunválaszt.

Ellenanyagok humanizálására szolgáló eljárások, mint például a CDR-graft eljárás, ismertek [Jones és munkatársai, *Nature*, 321, 522-525 (1986)]. Szintén ismertek eljárások olyan ellenanyag-fragmensek előállítására, amelyek még fajlagosan az eredeti ellenanyag antigénjére [Udaka és munkatársai, *Molec. Immunol.*, 27, 25-35 (1990)]. Egy másik lehetőség, hogy elkerüljük a találmány szerinti polipeptidek ellen termelődött ellenanyagok elleni immunválaszt, humán el-

ellenanyagoknak vagy ezek fragmenseinek vagy származékainak a használata.

Humán ellenanyagok előállíthatók izolált B-limfociták in vitro stimulálásával, vagy izolálhatók olyan (immortalizált) B-limfocitákból, amelyeket a találmány szerinti polipeptidek legalább egyikével immunizált nőből gyűjtöttünk.

A találmány egy további tárgyát képezi a ZP3 polipeptid és az ellene termelt ellenanyagok diagnosztikai készletekben való felhasználása.

Több humán ZP3 elleni ellenanyagot állítottunk elő. A gyakorlatban járatos személy készségén múlik olyan anti-idiotípus ellenanyagok előállítása, amelyek az ellenanyag antigén-kötőhelyét ismerik fel, és ezért mintegy az antigén "belső tükrképei"-nek felelnek meg.

Ezek az anti-idiotípus ellenanyagok nagyon jól használhatók vakcinázási és diagnosztikai célokra.

A mellékelt ábrák a találmány szerinti megoldást szemléltetik.

1. ábra: az I1, D1 és E1 EMBL klónok restrikciós térképei (A) és a humán ZP3 gén kromoszómális lokalizációja. Az exonokat fekete területekkel jelöltük. Restrikciós helyek: S, SalI; B, BamHI.

2. ábra: a humán ZP3 nukleotid- és aminosav-szekvenciája. Az 1064. pozícióban G, illetve C nukleotidot találtunk a kromoszómális, illetve a cDNS-ben. Ez a nyilvánvaló polimorfizmus Thr, illetve Arg aminosavakat eredményez. A nyilak exon kapcsolódásokat jelölnek. Az exon számozását a körökben adtuk meg. A poliadenilációs jelet aláhúzással jelöltük.

3. ábra: a ZP3 gén méretének csökkentése emlős expressziós vektorba való inszertáláshoz. Egy 2,7 kb méretű ZP3 "minigént" állítottunk össze a következő három fragmensből: A) PCR technológiával a leolvasási kerettel egybeesően egymással összekapcsolt 1. exon és 2. exon, amely egy EcoRI-XbaI fragmenst eredményezett; B) a 3. és 4. exont és az 5. exon egy részét tartalmazó kromoszomális XbaI-SalI fragmens; C) Az 5-8. exonokat tartalmazó SalI-HindIII ZP3 cDNS fragmens (mesteréges 3' BamHI és HindIII restrikciós helyekkel ellátva). A három fragmenst EcoRI és HindIII enzimekkel felnyitott pGEM vektorba (Promega) klónoztuk, ezt követően egy 2,7 kb méretű EcoRI-BamHI fragmensként egy emlős expressziós vektorba inszertáltuk az SV40 promoter mögé.

4. ábra: ZP3 mRNS kimutatása a ZP3 DNS-sel és humán petefészekből nyert poli(A)⁺RNS-sel (5 g) transzfektált CHO tömeg-tenyészetből előállított teljes RNS-ben (15 g).

1. sáv: CHO; 2. sáv: CHO ZP3 transzformánsok; 3. sáv: humán petefészek. Próbaként pGEM-be inszertált teljes ZP3 cDNS-t használtunk.

5. ábra: béta-Gal-ZP3 fúziós polipeptidek előállítása ZP3 cDNS inszerteket tartalmazó pEX plazmidot hordozó POP2136 E. coli törzsben.

A) Poliakrilamid gél (10 %) coomassie festése és B) Western lenyomat vizsgálat anti-ZP3-341-360 antiszérummal (1:150 higítás). Balról jobbra a következő mintákat töltöttük a gélre (-, indukció előtt; +, 2 órával az indukció után): kontroll pEX; pEX-ZP3A (KpnI-BamHI fragmens; teljes cDNS); pEX-ZP3B (KpnI-SalI framens; az 1-241 aminosavakat

kódoló, az 5. exonnál csonka cDNS); pEX-ZP3C (KpnI-SphI fargmens; az 1-102 aminosavakat kódoló, az 1. exon végén csonka cDNS); pEX-ZP3D (SmaI-BamHI fragmens; az 5. exon 3' végi fele + a 6., 7. és 8. exonok, amelyek az 257-372. aminosavakat kódolják). A molekulatömeg-jelzések (M) a bal szélén találhatók (kilodaltonban megadva). A baktériumokat 30 °C-on OD₆₀₀ = 0,5-1 eléréséig tenyésztettük, majd két órán át 42 °C-on indukáltuk. Egyenlő térfogatokat vettünk ki, centrifugáltuk, és a teljes sejtlizátumot vizsgáltuk.

6. ábra: különböző ellenanyagok kötődése (lásd: anyagok és módszerek) humán petesejtekhez. A FITC-vel jelölt második ellenanyag mennyiségét expozíciómérő készülékkel mértük és a kontroll százalékában fejeztük ki (100 % = sötét, 0 % = fluoreszkáló petesejtek). 1: kontroll; 2: humán zóna pellucida elleni antiszérum; 3: KLH elleni antiszérum; 4-8: ZP3(93-110), ZP3(172-190), ZP3(327-344), ZP3(341-360) és ZP3(362-372) elleni antiszérumok; 9: béta-Gal-ZP3 elleni antiszérum; 10: CHO-ban előállított rekombináns ZP3-mal immunizált három egér kevert széruma; 11: három kontroll egér kevert széruma. Megadtuk az átlagos expozíciós időt a kontroll százalékában kifejezve és az átlag standard hibáját.

7. ábra: a spermium-zóna kötődés gátlása anti-ZP3 ellenanyagokkal (lásd: anyagok és módszerek). 1: kontroll; 2: KLH elleni antiszérum; 3: humán zóna pellucida elleni antiszérum; 4: ZP3(93-110) ZP3(172-190), ZP3(341-360), és ZP3(362-372) elleni antiszérumok keveréke; 5: CHO-ban előállított rekombináns ZP3-mal immunizált három egér kevert széruma. Megadtuk a teljes zóna pellucidához kötődött spermiumok

átlagos számát és az átlag standard hibáját.

A következő példákban ismertetjük a humán ZP3 DNS-szekvencia izolálását, a humán ZP3 aminosav-szekvenciáját, ugyancsak bemutatunk egy eljárást ZP3 antigenitással rendelkező rekombináns polipeptid expresszáására és egy eljárást ilyen antigenitást mutató szintetikus polipeptid előállítására. Ezek a példák csupán a találmány szemléltetésére szolgálnak, és nem tekinthetők annak tárgykörét korlátozó megoldásoknak.

PÉLDÁK.

Anyagok és Módszerek

A rekombináns DNS technikák mindegyikénél alapvetően ismert eljárások szerint jártunk el [például, Sambrook és munkatársai, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2. kiadás, CSH-laboratory press, (1989)].

A restriktációs enzimeket és a DNS módosító enzimeket a gyártó cégek ajánlásai szerint használtuk.

A humán petefészek gt10 cDNS génkönyvtárat a Stratagene cégtől szereztük be.

Oligonukleotid-szintézis

Az oligonukleotidokat egy Applied Biosystems 381A DNS szintetizáló készülékkel állítottuk elő, és közvetlenül használtuk klónozási célra.

Peptidszintézis

Az oligopeptideket szilárd fázisú peptid szintézissel állítottuk elő Fields és Noble által ismertetett eljárás szerint [Int. J. Pept. Prot. Res., 35, 160-214 (1990)]. A

következő ZP3 peptideket szintetizáltuk (az aminosavakat hárombetűs kódjukkal jelöltük):

-ZP3(93-110):

GluValGlyLeuHisGluCysGlyAsnSerMetGlnValThrAspAlaLeu

-ZP3(172-190):

PheSerLeuArgLeuMetGluGluAsnTrpAsnAlaGluLysArgSerProThrPhe

-ZP3(327-344):

CysGlyThrProSerHisSerArgArgGlnProHisValMetSerGlnTrpSer

-ZP3(341-360):

SerGlnTrpSerThrSerAlaSerArgAsnArgArgHisValThrGluGluAlaAspVal

-ZP3(362-372):

CysValGlyAlaThrAspLeuProGlyGlnGluTrp.

Ellenanyag előállítás

Poliklonális szérumot állítottunk elő különböző antigénekkkel:

- **Teljes humán zóna pellucida.** Sóban tárolt humán zóna pellucidát hővel szolubilizáltunk és Freund adjuvánssal kevertük össze nyulak immunizálásához. Az antiszérum titereket sertés ZP-proteinekkal bevont 96 vályulatú mikrolemezeken vizsgáltuk.

- **Béta-Gal-ZP3 fúziós protein.** A fúziós proteint, annak oldhatatlanságát kihasználva, ultrahanggal kezelt baktériumokból részlegesen tisztítottuk, és SDS poliakrilamid gél-elektroforézissel (SDS-PAGE) szétválasztottuk. Elektro-leNyomat technikával a proteineket nitrocellulóz szűrőre vittük át. A hibrid proteint hordozó részt kivágtuk és DMSO-ban feloldottuk. Ezt 1:1 arányban Freund adjuvánssal kevertük, és nyulak immunizálására használtuk.

- **CHO által termelt ZP3.** Hasonló eljárást követtünk a kínai hörcsög petefészek (CHO) sejtek által termelt ZP3 protein esetében. A koncentrált tenyésztő folyadékot SDS-PAGE módszerével szétválasztottuk. A 40-60 kilodalton közé eső részt kivágtuk, és egerek immunizálására használtuk.

- **Oligopeptidek.** A szintetizált peptideket fizikai eljárással kürtőcsiga hemocianinhoz (KLH) kötöttük és nyulakba oltottuk. Kontrollként egyes nyulakat csak KLH-val immunizáltunk. A szérumokat peptiddel bevont 96 vályulatú mikrolemezekon vizsgáltuk.

Humán petesejt fluoreszcens vizsgálata

Sóban tárolt megtermékenyítetlen humán petesejteket (egy IVF program keretében spermiumokkal való 48 órás inkubációt követően) antiszérummal (1:50 hígítás A pufferben [PBS + 5 % BSA]) inkubáltunk. Három mosás után a petesejteket egy második (sertésben termelt, FITC-vel konjugált anti-nyúl vagy anti-egér, 1:100 hígítás A pufferben) ellenanyaggal hoztuk össze, és 1 órán át 37 °C-on inkubáltuk. Három további mosást követően a fluoreszcenciát Nikon mikroszkóppal és expozíciómérővel mértük. A nem festődött (negatív) kontroll petesejtek sötétek maradnak hosszú expozíciós idő mellett, míg a pozitívan festődött sejtek zóna pellucidája rövidebb expozíciós idővel rendelkezik.

Humán spermium-zóna kötési vizsgálat

Humán petesejteket (lásd fent) nyúlszérumban inkubáltunk, háromszor mostuk pufferrel (BWW + 3 % BSA), pufferben (kontroll), illetve ellenanyaggal (hígítatlan, 37 °C, 1 óra)

inkubáltuk, háromszor mostuk, és cseppnyi humán aktivált spermiumba (10^7 spermium/ml, 37 °C, 16 óra) helyeztük. A lazán megtapadt spermiumokat ismételt pipettázással eltávolítottuk a petesejtekről. A kötődött spermiumokat fixáltuk és 1 % glutáraldehidet és Hoechst-t (H33258, 20 g/ml) tartalmazó BWB-el festettük, és a kötődött spermiumok számát fluoreszcens mikroszkóp segítségével megszámoltuk.

EREDMÉNYEK

Egér ZP3 próba szintézise és konstrukciója

Egy 135 bázispárból álló egér ZP3 próbát állítottunk elő nyolc (27-51 bázisból álló) szintetikus oligonukleotid összekapcsolásával. Ezt a fragmenst, amely tartalmazta az egér gén 5. és 6. exonja egy részét [771-909 pozíció, Ringuette és munkatársai, *Developmental Biology*, 127, 287-295 (1988)] egyedi 5' BamHI és 3' HindIII restrikciós helyekkel láttuk el, és pGEM3 plazmidba (Promega) klónoztuk. Ezt követően igazoltuk a nukleotid-szekvenciát.

A humán ZP3 gén klónozása és jellemzése

Egy humán EMBL3 kromoszomális génkönyvtárat ^{32}P -vel jelölt ZP3 próbával vizsgáltunk (a fent ismertetett 135 bp fragmenssel). Három egymást átfedő EMBL klón erős hibridizációt mutatott, és ezeket részletesebben jellemeztük. Ezen klónok egy részének fizikai térképét az 1. ábra mutatja sematikusan. Az I1 és D1 klónokból a restrikciós fragmenseket pGEM vektorokba és M13mp18/19-be szubklónoztuk, és a humán gén kromoszomális jellemzésére használtuk. Ez magában foglalta az egér ZP3 szekvenciából nyert ^{32}P -vel jelölt oli-

gonukleotidokkal végzett Southern lenyomat vizsgálattal az exonok lokalizálását, és az ezt követő szekvenciavizsgálatot. Amint azt az 1. ábra mutatja a humán gén 8 exonból áll, amelyek körülbelül 20 kilobázis kromoszomális DNS-en oszlanak el. Mindegyik azonosított exont konszenzus illesztési donor és illesztési akceptor jelek (az ábra nem mutatja) határolnak. Az összes exon szekvenciavizsgálata alapján a ZP3 gén teljes kódoló szekvenciája kikövetkeztethető volt (a 2. ábra mutatja). A humán ZP3 gén egy 372 aminosavból álló, 41437 Dalton számított molekulatömeggel rendelkező polipeptidet kódol.

A humán ZP3 cDNS klónozása

A humán petefészek cDNS génkönyvtárát (gt10) humán ZP3 1., 5. és 7. exonokból nyert ^{32}P -vel jelölt fragmensekkel vizsgáltuk. Ez néhány olyan cDNS részlelet eredményezett, amelyek a ZP3 kódoló szekvenciájának csupán a 3' végi felét tartalmazták (5-8 exonok).

Három egymástól független cDNS klón szekvenciavizsgálata igazolta az előzőleg meghatározott kromoszomális ZP3 szekvencia helyességét, a 7. exonban található egyetlen nukleotid kivételével (lásd 2. ábra). Az 1064. nukleotid-pozícióban G illetve C nukleotidot találtunk a kromoszomális-, illetve a cDNS-ben. A kódolt aminosav-szekvenciában ez egy arginin, illetve egy treonin aminosavat eredményez a 345. pozícióban. Ez a szekvenciaeltérés valószínűleg a humán ZP3 génben és polipeptidben jelentkező polimorfizmust képviseli.

Rekombináns ZP3 expressziója CHO sejtekben

A CHO sejtekben való expresszió céljából a ZP3 gén mére-

tét oly mértékben kellett csökkentenünk, hogy egy emlős expressziós vektorba való inszerció lehetséges legyen. Különböző ZP3 DNS fragmenseket a 3. ábrán bemutatott "minigén" állítottunk össze. Az 1. és 2. exonokat PCR technológiával [Horton és munkatársai, *Gene*, 77, 61-68 (1989); Yon és Fried, *Nucl. Acids. Res.*, 17, 4895 (1989)] kapcsoltuk össze, és 5' végi EcoRI, illetve 3' végi XbaI restrikciós helyekkel láttuk el. Ezt követően ezt a DNS fragmenst ligáltuk a 3. és 4. exont, valamint az 5. exon egy részét hordozó kromoszomális XbaI-SalI fragmenssel, és egy SalI-HindIII fragmenszen az 5-8 exont tartalmazó cDNS részlettel. Az így kapott 2,7 kilobázis méretű "minigén" tartalmaz egy csonka intront a 2. és 3. exonok között és a természetes intronokat a ZP3 3. és 4., valamint 4. és 5. exonja között. Ezen ZP3 konstrukció polipeptidet kódoló nukleotid információjának az épségét a szekvenciavizsgálat teljességgel igazolta.

A ZP3 "minigént" ezt követően egy olyan emlős expressziós vektorba inszertáltuk, amelyben a ZP3 gént az erős SV40 korai promoter működteti. Ez a vektor rendelkezett továbbá az expresszált gén helyes RNS érési folyamatához szükséges béta-globin illesztési és SV40 poliadenilációs jelekkel és az aminoglikozil-foszfotranszferáz [Colbere-Garapin és munkatársai, *J. Mol. Biol.*, 150, 1-14 (1981)] szelekálásra alkalmas jelzőgénnel, amely lehetővé teszi a G418 rezisztencia alapján stabil transzformánsok izolálását. CHO sejteket kalcium-foszfát precipitációs technikával [Graham és van der Eb, *Virology*, 52, 456-467 (1973); Wigler és munkatársai, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76, 1373-1376

(1979)] transzfektáltunk a ZP3 expressziós konstrukcióval. G418 rezisztens transzformánsok nagy csoportját (300-500 független klónt) vizsgáltuk a rekombináns ZP3 gén expressziójára nézve.

Amint azt a 4. ábra szemlélteti, az összegyűjtött transzformánsokból nyert teljes RNS Northern lenyomat vizsgálata ^{32}P -vel jelölt ZP3 próbával a transzfektált ZP3 gén viszonylag magas szintű expresszióját mutatja (a nagy mennyiségben expresszált aktin génnel összehasonlítva, az ábra nem mutatja). Ezenkívül kimutattuk, hogy a minigén RNS helyesen megy át az mRNS-sé való érési folyamaton, amely mRNS kissé nagyobb, mint a humán petefészek RNS-ben található természetesen átírt mRNS (lásd 4. ábra). Ez a méretkülönbség legvalószínűbben az expressziós vektorban jelenlevő 5' és 3' végi határoló szekvenciáknak tudható be.

A rekombináns gén helyes hasítását és érését igazolta továbbá a G418 rezisztens CHO transzformánsokból izolált, az 1-5. exont hordozó cDNS részlet is. Ennek a cDNS-nek a szekvenciaadatai hasonlóak voltak a transzfektált DNS-hez, és alátámasztják azt a következtetést, hogy az intronok helyesen hasítódtak ki a ZP3 minigén transzkriptumból.

Növekvő tömeg-tenyészetek tápfolyadékát Western lenyomat technikával vizsgáltuk rekombináns ZP3 polipeptid jelenlétére. Deglikozilezett sertés ZP3 [Henderson és munkatársai, Gamete Research, 18, 251-265 (1987)] ellen termelt poliklonális antiszérummal rekombináns ZP3 polipeptideket lehetett kimutatni a tenyésztő folyadékban. Ez a jel hiányzott a nem transzfektált CHO sejtek tápfolyadékából.

Rekombináns ZP3 expressziója E. coliban

E. coliban való expresszió céljából először egy teljes hosszúságú ZP3 cDNS-t állítottunk elő CHO transzformánsokból PCR technológiával izolált, az 1-5. exonokat tartalmazó cDNS-ből és a humán petefészek cDNS génkönyvtárból izolált részleges (az 5-8. exonokat tartalmazó) cDNS klónból. Négy ZP3 cDNS szakaszt klónoztunk a leolvasási kerettel egybeesően E. coli LacZ génjéhez pEX plazmidokba (Biores), amely béta-galaktozidáz-ZP3 fúziós polipeptid termelését tette lehetővé, amint azt Stanley és Luzio ismertették [EMBO J., 3, 1429-1434 (1984)]. A fúziós polipeptidek expresszióját E. coliban SDS poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) és Western lenyomat technikával vizsgáltuk. Ezeknek a kísérleteknek az eredményeit az 5. ábra mutatja. Hősoikk indukciót követően mind a négy Lac-ZP3 konstrukció fúziós polipeptideket eredményezett, ámbár sokkal kisebb mértékben, mint a LacZ gén. A hibrid polipeptidek molekulatömege, amint azt coomassie-val festett géleken (lásd 5A ábra) megfigyeltük, egyezésben volt az expresszált ZP3 részletekkel. Ez további megerősítést nyert anti-béta-galaktozidáz ellenanyagokkal (az ábrán nem látható), és KLH-hoz kapcsolt, a ZP3 341-360. aminosav szakasza ellen termelt nyúl antiszérummal végzett Western lenyomat vizsgálattal (5B ábra). Csak az e szakaszt hordozó fúziós polipeptideket, vagyis a ZP3-A-t és a ZP3-D-t ismerte fel az antiszérum. A KLH ellen termelt antiszérum az 5B ábrán látható háttérfestéshez hasonló eredményt adott (az ábrán nem látható). A béta-Gal-ZP3 fúziós polipeptideket felismerte továbbá a teljes humán zóna pellucida ellen ter-

melt antiszérum (az ábrán nem látható).

ZP3 ellenanyagok kötődése humán petesejtekhez

Egy humán petesejt fluoreszcens vizsgálati módszert fejlesztettünk ki a különböző ZP ellenanyagok humán zóna pellucidához való kötődésének jellemzésére. Három különböző kísérlet eredményeit szemlélteti a 6. ábra. A KLH ellen termelt szérum és a normál egérszérum nem adott fluoreszcens festődést, míg a ZP komponensek ellen termelt összes antiszérum esetében erőstől közepesig terjedő fokú fluoreszcenciát figyeltünk meg. A bemutatott adatok alapján levonható az a következtetés, hogy a ZP3(93-110), a ZP3(172-190), a ZP3(327-344), a ZP3(341-360) és a ZP3(362-372) ellen termelt antiszérumok felismerik a humán petesejteket.

A ZP3 ellenanyagok hatása a spermium-petesejt felismerésre

A ZP3 ellenanyagok fogamzásgátló hatását egy humán spermium-zóna kötési vizsgálattal tanulmányoztuk. Ennek a vizsgálatnak az eredményeit a 7. ábra mutatja. A teljes humán zóna pellucida ellen termelt ellenanyagok 75 %-ban gátolták a spermium-zóna kötődést. A KLH ellen termelt antiszérum nem akadályozta a spermium-petesejt kötődést. Ezzel ellentétben a ZP3-peptidek ellen termelt ellenanyagok keveréke [ZP3(93-110), ZP3(172-190), ZP3(431-360) és ZP3(362-372) peptidek] 35 %-os relatív gátlást mutatott a spermium kötődésére nézve. A CHO sejtekből nyert rekombináns ZP3 ellen termelt ellenanyagok 55 %-kal csökkentették a spermium kötődést.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Humán ZP3 aktivitással vagy legalább részben humán ZP3 antigenitással rendelkező tiszta polipeptid vagy ennek funkcionális származéka.

2. Az 1. igénypont szerinti polipeptid, azzal jellemezve, hogy rekombináns úton készült.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti polipeptid, azzal jellemezve, hogy a következő szekvenciának legalább egy részét tartalmazza :

1

MetGluLeuSerTyrArgLeuPheIleCysLeuLeuLeuTrpGlySerThrGluLeuCys

21

TyrProGlnProLeuTrpLeuLeuGlnGlyGlyAlaSerHisProGluThrSerValGln

41

ProValLeuValGluCysGlnGluAlaThrLeuMetValMetValSerLysAspLeuPhe

61

GlyThrGlyLysLeuIleArgAlaAlaAspLeuThrLeuGlyProGluAlaCysGluPro

81

LeuValSerMetAspThrGluAspValValArgPheGluValGlyLeuHisGluCysGly

101

AsnSerMetGlnValThrAsnAspAlaLeuValTyrSerThrPheLeuLeuHisAspPro

121

ArgProValGlyAsnLeuSerIleValArgThrAsnArgAlaGluIleProIleGluCys

141

ArgTyrProArgGlnGlyAsnValSerSerGlnAlaIleLeuProThrTrpLeuProPhe

161

ArgThrThrValPheSerGluGluLysLeuThrPheSerLeuArgLeuMetGluGluAsn

181

TrpAsnAlaGluLysArgSerProThrPheHisLeuGlyAspAlaAlaHisLeuGlnAla

201

GluIleHisThrGlySerHisValProLeuArgLeuPheValAspHisCysValAlaThr

221

ProThrProAspGlnAsnAlaSerProTyrHuisThrIleValAspPheHisGlyCysLeu

241

ValAspGlyLeuThrAspAlaSerSerAlaPheLysValProArgProGlyProAspThr

261

LeuGlnPheThrValAspValPheHisPheAlaAsnAspSerArgAsnMetIleTyrIle

281

ThrCysHisLeuLysValThrLeuAlaGluGlnAspProAspGluLeuAsnLysAlaCys

301

SerPheSerLysProSerAsnSerTrpPheProValGluGlyProAlaAspIleCysGln

321

CysCysAsnLysGlyAspCysGlyThrProSerHisSerArgArgGlnProHisValMet

341

SerGlnTrpSerThrSerAlaSerArgAsnArgArgHisValThrGluGluAlaAspVal

361

ThrValGlyAlaThrAspLeuProGlyGlnGluTrp

4. Az 1., 2. vagy 3. igénypont szerinti polipeptid, az-
zal jellemezve, hogy legalább részben glikozilezett.

5. A 3. vagy 4. igénypont szerinti polipeptid, azzal
jellemezve, hogy a következő szekvenciák legalább egyikét
tartalmazza:

-ThrLeuMetValMetValSerLys-,

-SerArgArgGlnProHisValMetSerGln-,
 -GluValGlyLeuHisGluCysGlyAsnMetSerGlnValThrAspAspAlaLeu-,
 -PheSerLeuArgLeuMetGluGluAsnTrpAsnAlaGluLysArgSerProThrPhe-,
 -CysGlyThrProSerHisSerArgArgGlnProHisValMetSerGlnTrpSer-,
 vagy
 -SerGlnTrpSerThrSerAlaSerArgAsnArgArgHisValThrGluGlu
 AlaAspValCysValGlyAlaThrAspLeuProGlyGlnGluTrp-,

6. Humán ZP3 aktivitással vagy legalább részben humán ZP3 antigenitással rendelkező polipeptid, azzal jellemezve, hogy a következő szekvencia legalább egy részét tartalmazza:
 -SerGlnTrpSerThrSerAlaSerArgAsnArgArgHisValThrGluGluAlaAsp Val-.

7. Nukleinsav-szekvencia, azzal jellemezve, hogy az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid legalább egy részét kódolja.

8. A 7. igénypont szerinti nukleinsav-szekvencia, azzal jellemezve, hogy a következő szekvencia vagy annak funkcionális származékai legalább egy részét tartalmazza:

10	20	30	40	50	60
GAGGCGGCTGCCTGCTGCTCTGCAGGTACCATGGAGCTGAGCTATAGGCTCTTCATCTGC					
70	80	90	100	110	120
CTCCTGCTCTGGGGTAGTACTGAGCTGTGCTACCCCCAACCCTCTGGCTCTTGCAGGGT					
130	140	150	160	170	180
GGAGCCAGCCATCCTGAGACGTCCGTACAGCCCGTACTGGTGGAGTGTCAGGAGGCCACT					
190	200	210	220	230	240
CTGATGGTCATGGTCAGCAAAGACCTTTTTGGCACCGGAAGCTCATCAGGGCTGCTGAC					
250	260	270	280	290	300
CTCACCTTGGGCCAGAGGCCTGTGAGCCTCTGGTCTCCATGGACACAGAAGATGTGGTC					

310	320	330	340	350	360
AGGTTTGAGGTTGGACTCCACGAGTGTGGCAACAGCATGCAGGTAAGTACGATGCCCTG					
370	380	390	400	410	420
GTGTACAGCACCTTCCTGCTCCATGACCCCCGCCCCGTGGGAAACCTGTCCATCGTGAGG					
430	440	450	460	470	480
ACTAACCGCGCAGAGATTCCCATCGAGTGCCGCTACCCCAGGCAGGGCAATGTGAGCAGC					
490	500	510	520	530	540
CAGGCCATCCTGCCCACCTGGTTGCCCTTCAGGACCACGGTGTTCCTCAGAGGAGAAGCTG					
550	560	570	580	590	600
ACTTTCTCTCTGCGTCTGATGGAGGAGAACTGGAACGCTGAGAAGAGGTCCCCCACCTTC					
610	620	630	640	650	660
CACCTGGGAGATGCAGCCCACCTCCAGGCAGAAATCCACACTGGCAGCCACGTGCCACTG					
670	680	690	700	710	720
CGGTTGTTTGTGGACCACTGCGTGGCCACACCGACACCAGACCAGAATGCCTCCCCTTAT					
730	740	750	760	770	780
CACACCATCGTGGACTTCCATGGCTGTCTTGTCGACGGTCTCACTGATGCCTCTTCTGCA					
790	800	810	820	830	840
TTCAAAGTTCCTCGACCCGGGCCAGATACTCCAGTTCACAGTGGATGTCTTCCACTTT					
850	860	870	880	890	900
GCTAATGACTCCAGAAACATGATATACATCACCTGCCACCTGAAGGTCACCCTAGCTGAG					
910	920	930	940	950	960
CAGGACCCAGATGAACTCAACAAGGCCTGTTTCCTTCAGCAAGCCTTCCAACAGCTGGTTC					
970	980	990	1000	1010	1020
CCAGTGGAAGGCCCGGCTGACATCTGTCAATGCTGTAACAAAGGTGACTGTGGCACTCCA					
1030	1040	1050	1060	1070	1080
AGCCATTCCAGGAGGCAGCCTCATGTGATGAGCCAGTGGTCCACGTCTGCTTCCCGTAAC					
1090	1100	1110	1120	1130	1140
CGCAGGCATGTGACAGAAGAAGCAGATGTCACCGTGGGGGCCACTGATCTTCCTGGACAG					

1150	1160	1170	1180	1190	1200
GAGTGGTGACCATGAAGTAGAGCAGTGGGCTTTGCCTTCTGACACCTCAGTGGTGCTGCT					
1210	1220	1230	1240	1250	1260
GGGCGTAGGCCTGGCTGTGGTGGTGTCCCTGACTCTGACTGCTGTTATCCTGGTTCTCAC					
1270	1280	1290	1300	1310	
CAGGAGGTGTCGCACTGCCTCCCACCCTGTGTCTGCTTCCGAATAAAAGAAGAAA					

9. Vektor, azzal jellemezve, hogy a 7. vagy 8. igénypont szerinti nukleinsav szekvenciát tartalmazza.

10. Gazdasejt, azzal jellemezve, hogy egy a 9. igénypont szerinti nukleinsav szekvenciát vagy a 7. vagy 8. igénypont szerinti szekvenciát tartalmaz.

11. Gyógyszerkompozíció, azzal jellemezve, hogy egy az 1.-6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet tartalmaz.

12. Immunológiai fogamzásgátló vakcina, azzal jellemezve, hogy egy az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet, és egy adjuvánst tartalmaz.

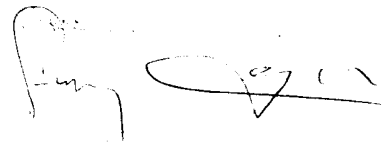
13. Immunológiai fogamzásgátló vakcina, azzal jellemezve, hogy egy az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptidet felismerő ellenanyagot tartalmaz.

14. Eljárás az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid előállítására, azzal jellemezve, hogy az ilyen polipeptidet kódoló nukleinsav-szekvenciát tartalmazó vektorral egy gazdasejtet transzformálunk, az említett gazdasejtet alkalmas tápfolyadékban tenyésztjük, és a tenyészetből a polipeptidet izoláljuk.

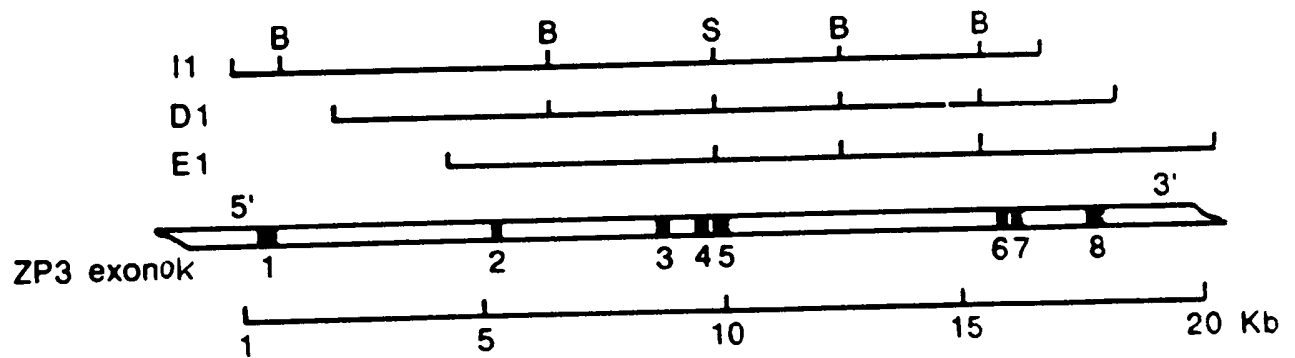
15. Eljárás az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti polipeptid elleni ellenanyag előállítására, azzal jellemezve,

hogy egy alkalmas állatot az említett polipeptiddel és adjuvánssal oltunk, megfelelő idő elteltével az említett állat B-limfocitáit összegyűjtjük, kiválasztjuk az ellenanyag termelő sejteket, folyamatos növekedésűvé tesszük, ezután tenyésztjük, és az ellenanyagokat a tenyészetből izoláljuk.

A meghatalmazott:



2023.03.01
3. sz. melléklet
Balesi Zs.
Balesi Zs.



1. ÁBRA

Handwritten signatures and initials:
Piny
Tow

P9300537

8/2

2. ABRA

5' 60
gaggcggtgcctgctgctctgcaggtaccATGGAGCTGAGCTATAGGCTCTTCATCTGC
MetGluLeuSerTyrArgLeuPheIleCys

120
CTCCTGCTCTGGGGTAGTACTGAGCTGTGCTACCCCCAACCCCTCTGGCTCTTGCAGGGT
LeuLeuLeuTrpGlySerThrGluLeuCysTyrProGlnProLeuTrpLeuLeuGlnGly

180
GGAGCCAGCCATCCTGAGACGTCCGTACAGCCCGTACTGGTGGAGTGTGAGGAGGCCACT
GlyAlaSerHisProGluThrSerValGlnProValLeuValGluCysGlnGluAlaThr

240
CTGATGGTCATGGTCAGCAAAGACCTTTTTGGCACCGGAAGCTCATCAGGGCTGCTGAC
LeuMetValMetValSerLysAspLeuPheGlyThrGlyLysLeuIleArgAlaAlaAsp

300
CTCACCTTGGGCCCAGAGGCCTGTGAGCCTCTGGTCTCCATGGACACAGAAGATGTGGTC
LeuThrLeuGlyProGluAlaCysGluProLeuValSerMetAspThrGluAspValVal

360
AGGTTTGAGGTTGGACTCCACGAGTGTGGCAACAGCATGCAGGTA¹ACTGACGATGCCCTG²
ArgPheGluValGlyLeuHisGluCysGlyAsnSerMetGlnValThrAspAspAlaLeu

420
GTGTACAGCACCTTCCTGCTCCATGACCCCCGCCCCGTGGGAAACCTGTCCATCGTGAGG
ValTyrSerThrPheLeuLeuHisAspProArgProValGlyAsnLeuSerIleValArg

480
ACTAACCGCGCAGAGATTCCCATCGAGTGCCGCTACCCCAGGCAGGGCAATGTGAGCAGC²
ThrAsnArgAlaGluIleProIleGluCysArgTyrProArgGlnGlyAsnValSerSer³

540
CAGGCCATCCTGCCCACCTGGTTGCCCTTCAGGACCACGGTGTCTCAGAGGAGAAGCTG
GlnAlaIleLeuProThrTrpLeuProPheArgThrThrValPheSerGluGluLysLeu

600
ACTTTCTCTCTGCGTCTGATGGAGGAGA³ACTGGAACGCTGAGAAGAGGTCCCCACCTTC⁴
ThrPheSerLeuArgLeuMetGluGluAsnTrpAsnAlaGluLysArgSerProThrPhe

660
CACCTGGGAGATGCAGCCCACCTCCAGGCAGAAATCCACACTGGCAGCCACGTGCCACTG
HisLeuGlyAspAlaAlaHisLeuGlnAlaGluIleHisThrGlySerHisValProLeu

720
CGGTTGTTTGTGGACCACTGCGTGGCCACACCGACACCAGACCAGAATGCCTCCCCTTAT
ArgLeuPheValAspHisCysValAlaThrProThrProAspGlnAsnAlaSerProTyr

780
CACACCATCGTGGACTTCCATGGCTGTCTTGTGACGGTCTCACTGATGCCTCTTCTGCA⁴
HisThrIleValAspPheHisGlyCysLeuValAspGlyLeuThrAspAlaSerSerAla⁵

840
TTCAAAGTTCCTCGACCCGGGCCAGATACACTCCAGTTCACAGTGGATGTCTTCCACTTT
PheLysValProArgProGlyProAspThrLeuGlnPheThrValAspValPheHisPhe

fury 120

P9300537

8/3

2. ABRA FOLYT.

5 6 900
GCTAATGACTCCAGAAACATGATATACATCACCTGCCACCTGAAGGTCACCCTAGCTGAG
AlaAsnAspSerArgAsnMetIleTyrIleThrCysHisLeuLysValThrLeuAlaGlu

6 7 960
CAGGACCCAGATGAACTCAACAAGGCCTGTTCTTCAGCAAGCCTTCCAACAGCTGGTTC
GlnAspProAspGluLeuAsnLysAlaCysSerPheSerLysProSerAsnSerTrpPhe

1020
CCAGTGGAAGGCCCGGCTGACATCTGTCAATGCTGTAACAAAGGTGACTGTGGCACTCCA
ProValGluGlyProAlaAspIleCysGlnCysCysAsnLysGlyAspCysGlyThrPro

1080
AGCCATTCCAGGAGGCAGCCTCATGTGTCATGAGCCAGTGGTCCAGGTCTGCTTCCCGTAAC
SerHisSerArgArgGlnProHisValMetSerGlnTrpSerArgSerAlaSerArgAsn

7 8 1140
CGCAGGCATGTGACAGAAGAAGCAGATGTCACCGTGGGGGCCACTGATCTTCCTGGACAG
ArgArgHisValThrGluGluAlaAspValThrValGlyAlaThrAspLeuProGlyGln

1200
GAGTGGtgaccatgaagtagagcagtgaggctttgccttctgacacctcagtggtgctgct
GluTrp

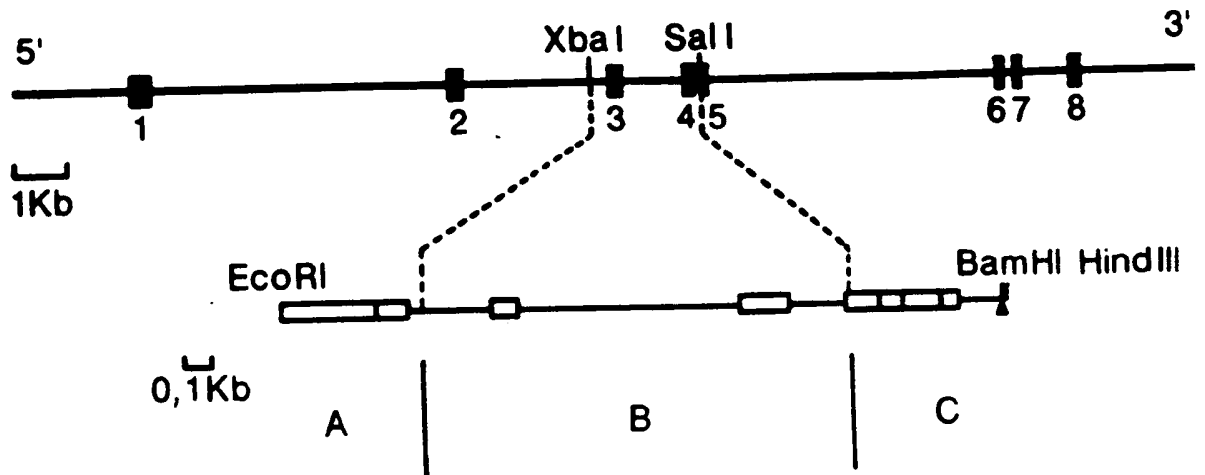
1260
gggcgtaggcctggctgtggtggtgtccctgactctgactgctgttatcctgggttctcac

1314 3'
caggaggtgtgcactgcctcccaccctgtgtctgcttccgaataaaagaagaaa

Fing Tol

P9300537

8/4



3. ÁBRA

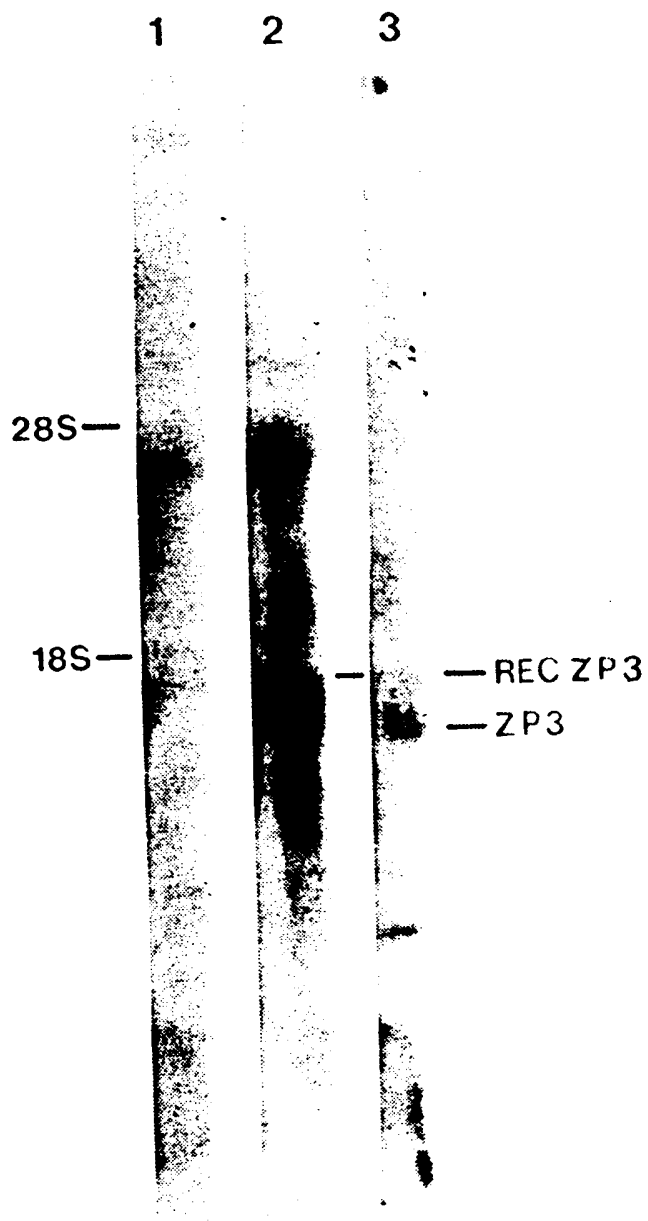
Fény Tör

20282

P9300537

8/5

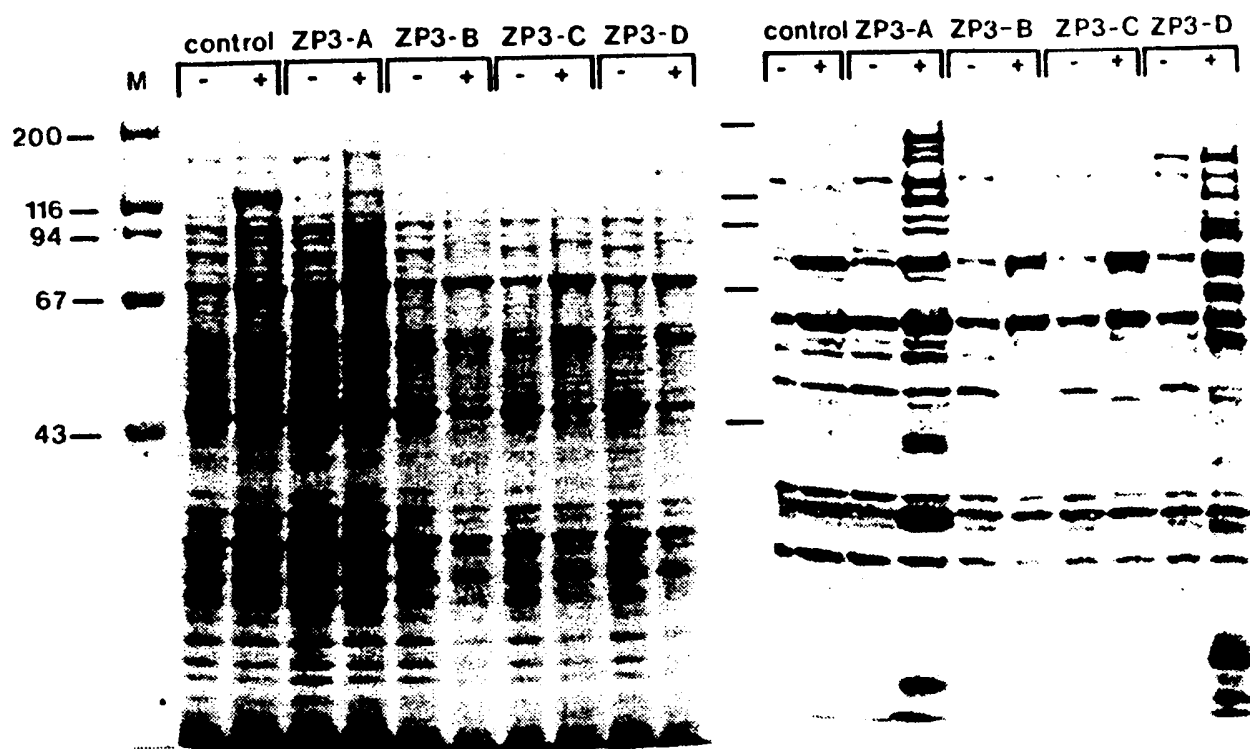
4. ÁBRA



Handwritten signature

P9300537

8/6

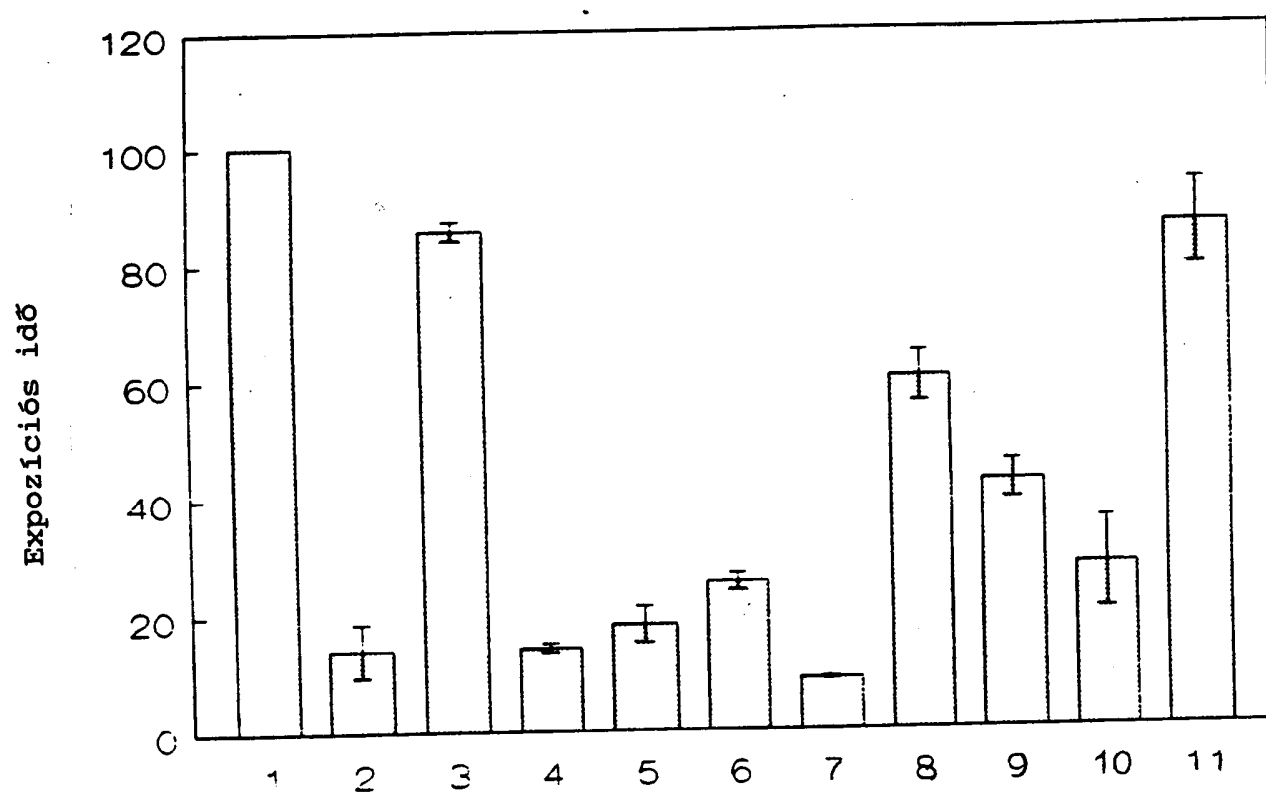


5. ÁBRA

Piny Tor

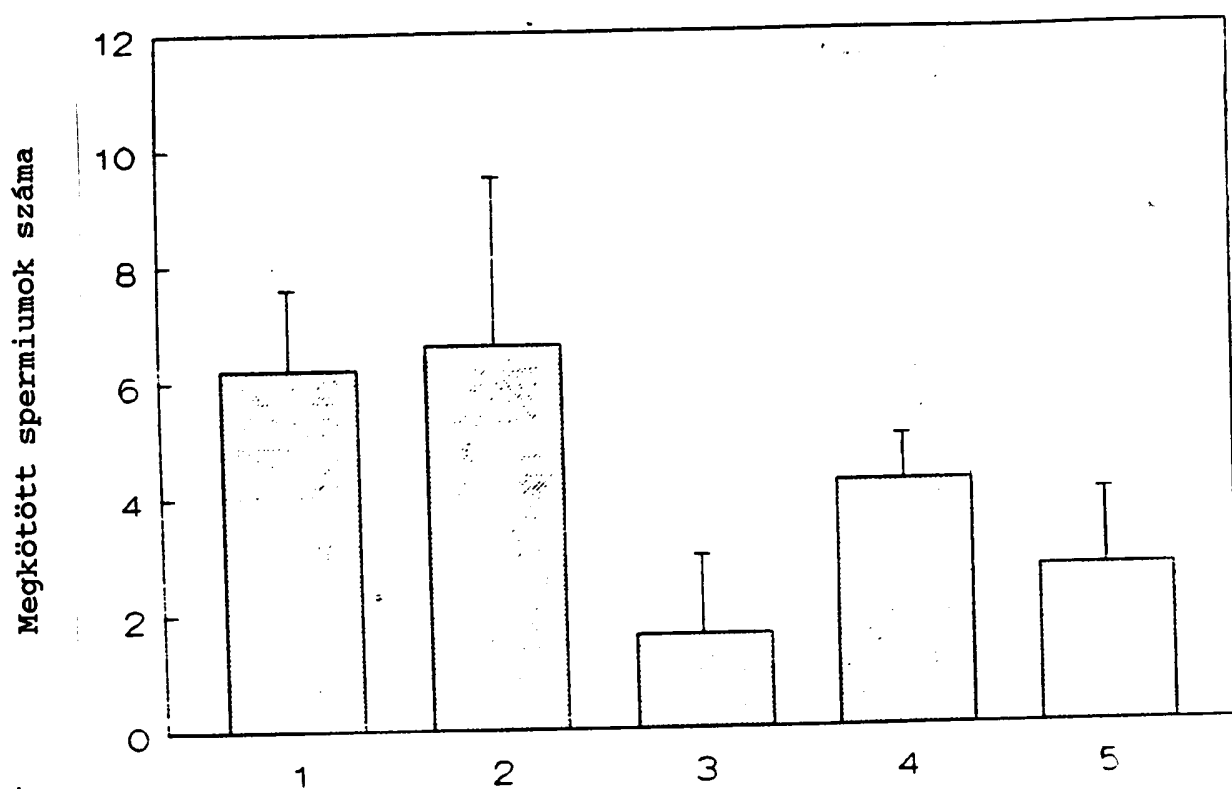
P9300537

8/7



6. ÁBRA

Felix Torro



7. ÁBRA